

Spiegelt die strukturelle Diversität von Neuregulin-1 seine funktionelle Diversität wieder?

Expression und Funktion von Neuregulin-1
und seinen Rezeptoren
im intakten und verletzten ZNS

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, Chemie und Geowissenschaften

Fachgebiet Biologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

angefertigt am
Max-Planck-Institut für Neurobiologie
in Martinsried

vorgelegt von
Gabriele Kerber
aus Emden

Martinsried, Juni 2000

Dekan: Herr Prof. Dr. R. Renakwitz

1. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. E. Schwartz

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. G. W. Kreutzberg

Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in der Abteilung für Neuromorphologie angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. W. Kreutzberg, daß ich meine Arbeit in seiner Abteilung unter den besten zu wünschenden Arbeitsbedingungen und in angenehmem Arbeitsklima durchführen konnte.

Herrn Prof. Dr. E. Schwartz gilt mein besonderer Dank für die Betreuung der Arbeit von Seiten der Justus-Liebig-Universität Gießen und für das Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat.

Herrn Dr. G. Hager und Herrn Prof. Dr. G. W. Kreutzberg danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Dr. G. Hager gilt mein besonderer Dank für die vielen Diskussionen, Anregungen und die unermüdliche Betreuung im Laufe der vergangenen Jahre.

Frau Dr. A. Horvat, Herrn R. Streif, Herrn Dr. F.-W. Schwaiger und Herrn F. Bröcker danke ich für die vielen Diskussionen und Hilfestellungen im Labor bzw. am Computer. Außerdem danke ich für die vielen Anlässe zu lachen, die die Arbeit weniger schwierig und die Mißerfolge weniger tragisch erscheinen ließen!

Bei Frau K. Brückner, Herrn Dr. J. Chalcraft und Herrn R. Schorner bedanke ich mich für die klassischen und digitalen Bildbearbeitungen, Ausdrucke und Photoabzüge, die meistens im letztmöglichen Moment angefertigt werden mußten!

Allen Mitarbeitern in unserer Arbeitsgruppe und in der gesamten Abteilung danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Hilfe bei vielen kleinen und größeren Kleinigkeiten, die allein kaum zu bewältigen gewesen wären.

Mein größter Danke jedoch geht an meine Eltern, meine Schwester und Frau I. Klör, die mir immer zur Seite gestanden haben, mich aufgebaut, mich auf Höhenflügen begleitet oder mich wieder auf den Boden der Tatsachen zurückgeholt haben. Ohne ihre Hilfe läge die Arbeit in dieser Form nicht vor und die letzten Jahre wären nicht so schön gewesen!

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	4
1.1	NEUREGULINE UND IHRE REZEPTOREN	4
1.1.1	NEUREGULIN-1	4
1.1.2	ERBB-REZEPTOR TYROSINKINASEN	8
1.1.3	FUNKTIONEN DES NEUREGULIN-1-ERBB SIGNALNETZWERKS	9
1.2	REGENERATION DES FAZIALISNERVS NACH EINER PERIPHEREN LÄSION	12
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	TIERE UND GEWEBSGEWINNUNG	14
2.1.1	OPERATION	14
2.1.2	TÖTUNG DER TIERE	15
2.1.3	BESCHICHTUNG VON OBJEKTTRÄGERN	15
2.1.4	HERSTELLUNG VON GEFRIERSCHNITTEN	16
2.1.5	AUSSTANZEN VON FAZIALISKERNEN	16
2.2	ZELLKULTUREN	16
2.2.1	GLIALE KULTUREN	16
2.2.1.1	Aufreinigung von Astrozyten-angereicherten Kulturen	17
2.2.2	SUBSTANTIA NIGRA NEURONE	18
2.2.3	AKUTE MOTONEURONE	18
2.3	IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON PROTEINEN	19
2.3.1	IMMUNHISTOCHEMIE	19
2.3.2	KONFOKALE LASER SCANNING MIKROSKOPIE	20
2.4	WESTERNBLOT	21
2.4.1	TRITONLYSE VON ZELLEN UND GEWEBEN	21
2.4.2	SDS-GELELEKTROPHORESE	22
2.4.3	ÜBERTRAGUNG DER PROTEINE AUF MEMBRAN	22
2.4.3.1	Tankblot	22
2.4.3.2	Halbtrockener Blot	23
2.4.4	KONTROLLE DER PROTEINÜBERTRAGUNG	23
2.4.5	ANTIKÖRPER-MARKIERUNG VON PROTEINBANDEN	24
2.4.6	ANTIKÖRPERDETEKTION MITTELS CHEMOLUMINESZENZ	24
2.5	POLYMERASE-KETTEN-REAKTION NACH REVERSER TRANSKRIPTION	25
2.5.1	RNA-ISOLATION	26
2.5.1.1	Isolation von Total-RNA mittels Phenol-Extraktion	26
2.5.1.2	Isolation von mRNA	27
2.5.2	REVERSE TRANSKRIPTION	28
2.5.3	KONSTRUKTION SPEZIFISCHER PRIMER	29
2.5.4	RT-PCR-GRUNDPROTOKOLL	31
2.5.5	SEMIQUANTITATIVE RT-PCR	33
2.5.5.1	Semiquantitative zweistufige RT-PCR	35
2.5.6	POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE VON PCR-PRODUKT	36
2.5.7	AUSWERTUNG SEMIQUANTITATIVER RT-PCR	36

2.6	<i>IN-SITU</i>-HYBRIDISIERUNG	38
2.6.1	KLONIERUNG VON PCR-FRAGMENTEN IN E. COLI	38
2.6.2	PLASMIDPRÄPARATION	40
2.6.3	SYNTHESE DER RIBONUKLEOTIDSONDEN	41
2.6.4	<i>IN-SITU</i> -HYBRIDISIERUNG	42
2.6.5	DETEKTION DER RADIOAKTIVEN SONDE NACH <i>IN-SITU</i> -HYBRIDISIERUNG	42
2.7	STIMULATION KULTIVierter ASTROZyTEN MIT NEUREGULIN-α UND -β	43
2.7.1	APOPTOSE-TEST	43
2.7.2	PROLIFERATIONS-TEST	45

3 ERGEBNISSE **46**

3.1	KLONIERUNG UND SEQUENZIERUNG DER NEUREGULIN-1 TYP-II UND -III N-TERMINI	46
3.2	NEUREGULIN-1 UND SEINE REZEPTOREN IM ADULTEN GEHIRN	48
3.2.1	NEUREGULIN-1 VERTEILUNG IM ADULTEN GEHIRN	48
3.2.1.1	Immunhistochemie	48
3.2.1.2	Westernblot-Analyse von Neuregulin-1	51
3.2.1.3	<i>In-situ</i> -Hybridisierung	51
3.2.1.4	RT-PCR	52
3.2.2	VERTEILUNG VON ERBB-2, ERBB-3 UND ERBB-4 IM ADULTEN GEHIRN	56
3.3	STIMULATION KULTIVierter ASTROZyTEN MIT NEUREGULIN-1 α- UND β-ISOFORMEN	57
3.4	EXPRESSION VON NEUREGULIN-1 UND ERBB-REZEPTOREN IM FAZIALISKERN NACH PERIPHERER LÄSION DES NERVS	60
3.4.1	IMMUNHISTOCHEMISCHE MARKIERUNG VON NEUREGULIN-1 IM FAZIALISKERN NACH PERIPHERER LÄSION	60
3.4.2	SEMIQUANTITATIVE UNTERSUCHUNG DER ISOFORMSPEZIFISCHEN NEUREGULIN-1 EXPRESSION IM FAZIALISKERN NACH PERIPHERER LÄSION DES NERVS	62
3.4.3	ZELLULÄRE LOKALISATION DER NEUREGULIN-1 TYPEN IM FAZIALISKERN NACH PERIPHERER NERVENLÄSION MITTELS <i>IN-SITU</i> -HYBRIDISIERUNG	66
3.4.4	SEMIQUANTITATIVE ANALYSE DER ERBB-REZEPTOR TYROSINKINASEN EXPRESSION IM FAZIALISKERN NACH PERIPHERER NERVENLÄSION	68

4 DISKUSSION **70**

4.1	NEUREGULIN-1 ISOFORMEN WERDEN HIRNREGIONS- UND ZELLSPEZIFISCH EXPRIMIERT, WÄHREND DIE VERTEILUNG DER ERBB-REZEPTOR TYROSINKINASEN UBIQUITÄR IST	70
4.2	NEUREGULIN-α UND -β INDUZIEREN APOPTOSE UND PROLIFERATION IN KULTIVierten ASTROZyTEN	73
4.3	BESTIMMTE NEUREGULIN-1 ISOFORMEN UND ERBB-REZEPTOREN UNTERLIEGEN EINER TRANSKRIPTIONALEN REGULIERUNG NACH EINER PERIPHEREN FAZIALISLÄSION	75

5 ZUSAMMENFASSUNG **81**

6 ANHANG **84**

6.1	LÖSUNGEN	84
6.1.1	PUFFER	84

6.1.2	MEDIEN	86
6.1.3	FARBLÖSUNGEN	88
6.1.4	SONSTIGES	88
6.2	FACS-ANALYSEN NEUREGULIN-STIMULierter ASTROZYTEN	90
6.2.1	AUSGANGSDATEN ZUR APOPTOSE-BESTIMMUNG	90
6.2.2	AUSGANGSDATEN ZUR PROLIFERATIONS-BESTIMMUNG	91
6.3	REGULIERUNG VON NEUREGULIN-1 ISOFORMEN UND ERBB-Rezeptor	
	TYROSINKINASEN IM FAZIALISKERN NACH PERIPHER NERVENLÄSION	92
7	REFERENZLISTE	102



1 Einleitung

1.1 Neureguline und ihre Rezeptoren

Die Neureguline bilden eine Familie transmembraner und extrazellulärer Matrixproteine, die von mehreren Genen codiert werden. Zur Zeit sind vier Neuregulin-Gene bekannt (Nrg-1 bis -4) (Falls et al., 1993; Carraway, III et al., 1997; Zhang et al., 1997; Chang et al., 1997; Busfield et al., 1997; Harari et al., 1999), von denen drei erst im Laufe der letzten drei Jahre gefunden wurden. Mindestens zwei dieser vier Gene (Nrg-1 und Nrg-2) enthalten Stellen alternativen Spleißens (Wen et al., 1992; Marchionni et al., 1993; Chang et al., 1997) und haben somit das Potential zur Bildung einer großen Zahl an Isoformen auf Proteinebene. Die strukturelle Vielfalt der Neureguline wird außerdem noch durch Modifikation der Proteine, z. B. durch proteolytische Spaltung und Glykosylierung, erhöht. Alle Neureguline, unabhängig von Gen und Isoform, enthalten als gemeinsames Motiv eine dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF (epidermal growth factor) ähnliche Domäne, die für die Rezeptorbindung notwendig und ausreichend ist (Holmes et al., 1992). Die EGF-ähnliche Domäne und ihre Bindung an eine bestimmte Rezeptorgruppe, die erbB-Rezeptor Tyrosinkinasen, stellt das verbindende Glied der Neuregulin-Proteinfamilie dar.

1.1.1 Neuregulin-1

Das Neuregulin-1-Gen besitzt neben mehreren alternative Spleißstellen (Wen et al., 1992; Marchionni et al., 1993) möglicherweise mehrere Promotoren. Theoretisch sind 88 verschiedene Neuregulin-1 Transkripte möglich, von denen wahrscheinlich nur ein Bruchteil in der Natur vorkommt. Neuregulin-1 bindet direkt an die Rezeptor Tyrosinkinasen erbB-3 und erbB-4 und indirekt an den Ko-Rezeptor erbB-2 (zusammengefasst in (Alroy und Yarden, 1997)). Die meisten bisher bekannten Aktivitäten von Neuregulin-1 Produkten stehen mit Determination, Proliferation, Differenzierung und Reifung verschiedenster Zelltypen im Zusammenhang (Peles und Yarden, 1993; Carraway, III und Burden, 1994; Lemke, 1996). Aufgrund seiner Rolle in verschiedenen biologischen Zusammen-



hänge, z. B. der Proliferation von Schwann-Zell, der Expressionsregulation von Acetylcholin-Rezeptoruntereinheiten bzw. wegen seiner Bindungsaffinität zu erbB-Rezeptoren, wurde Neuregulin-1 gleichzeitig in verschiedenen Zusammenhängen und Spezies gefunden. Daraus erklärt sich die Vielzahl an Namen für ein einziges Gen und seine Produkte. Zu diesen gehören ARIA (acetylcholin receptor inducing activity) (Harris et al., 1988; Falls et al., 1993), Heregulin (Holmes et al., 1992), NDF (neu differentiation factor) (Wen et al., 1992) GGF (glial growth factor) (Brockes et al., 1981; Marchionni et al., 1993) und SMDF (sensory and motor neuron derived factor) (Ho et al., 1995). Nachdem einige dieser Proteine als unterschiedliche Produkte eines einzigen Gens erkannt worden waren, wurden sie unter dem Namen Neureguline (von *neu* und Heregulin) zusammengefaßt (Marchionni et al., 1993).

Die verschiedenen Neuregulin-1 Produkte unterscheiden sich in fünf Domänen: im N-Terminus, einer Glykosylierungsdomäne, der EGF-ähnlichen Domäne, der direkt daran anschließenden Juxtamembrandomäne sowie in der cytoplasmatischen Domäne (Abb. 1.1) (Wen et al., 1992) (Ben-Baruch und Yarden, 1994; Fischbach und Rosen, 1997; Shinoda et al., 1997).

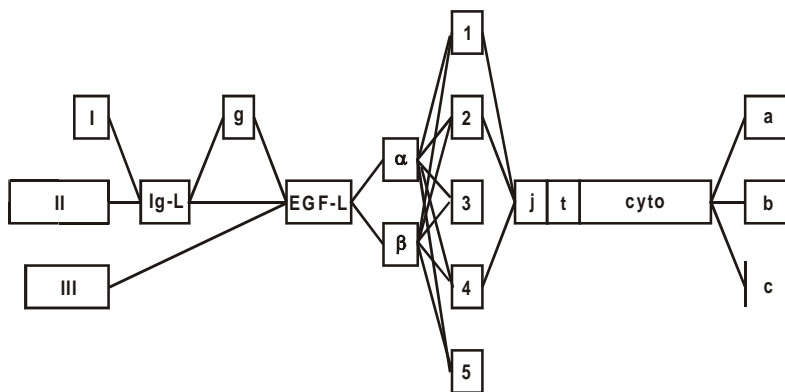


Abb.1.1 Schematische Darstellung von Neuregulin-1 mit seinen alternativen Spleißvarianten. Die Ziffern I-III markieren die drei N-Termini des Proteins, Ig-L steht für die Immunglobulin-ähnliche Domäne, die den Neuregulinen der Typen-I und -II gemeinsam ist, g bezeichnet die Glykosylierungsdomäne, die in einigen Isoformen der Typen-I und -II vorkommt. EGF-L markiert den allen Neuregulin-1 Produkten gemeinsamen Teil der EGF-ähnlichen Domäne, α und β die beiden alternativen Spleißvarianten der EGF-ähnlichen Domäne. Direkt dahinter befindet sich die alternative Spleißstelle der Juxtamembrandomäne, die zu fünf verschiedenen Isoformen führt (1-5), von denen zwei (3 und 5) mit einem Stopcodon enden. Die anderen drei Varianten setzen sich mit einem gemeinsamen Bereich der Juxtamembrandomäne (j), der Transmembrandomäne (t) und der cytoplasmatischen Domäne (cyto) fort, die im C-terminalen Bereich eine weitere alternative Spleißstelle mit drei möglichen Varianten (a, b und c) enthält, wobei die Variante c nur aus einem Stopcodon anstelle eines codierenden Bereiches besteht. (Nach Fischbach und Rosen, 1997, verändert.)

die in einigen Isoformen der Typen-I und -II vorkommt. EGF-L markiert den allen Neuregulin-1 Produkten gemeinsamen Teil der EGF-ähnlichen Domäne, α und β die beiden alternativen Spleißvarianten der EGF-ähnlichen Domäne. Direkt dahinter befindet sich die alternative Spleißstelle der Juxtamembrandomäne, die zu fünf verschiedenen Isoformen führt (1-5), von denen zwei (3 und 5) mit einem Stopcodon enden. Die anderen drei Varianten setzen sich mit einem gemeinsamen Bereich der Juxtamembrandomäne (j), der Transmembrandomäne (t) und der cytoplasmatischen Domäne (cyto) fort, die im C-terminalen Bereich eine weitere alternative Spleißstelle mit drei möglichen Varianten (a, b und c) enthält, wobei die Variante c nur aus einem Stopcodon anstelle eines codierenden Bereiches besteht. (Nach Fischbach und Rosen, 1997, verändert.)



Bisher sind drei verschiedene N-Termini des Neuregulin-1 Gens bekannt, die möglicherweise auf der Aktivität verschiedener Promotoren beruhen. Den N-Termini entsprechend werden die verschiedenen Proteine in drei Typen eingeteilt (Typ-I bis -III). Der N-Terminus des Typs-I (Heregulin, NDF, ARIA) beinhaltet eine Immunglobulin- (Ig-) ähnliche Domäne, der des Typs-II (GGF) eine Kringle-Domäne, Signalpeptide und dieselbe Ig-ähnliche Domäne wie Typ-I. Diese kann an Heparansulfate binden (Loeb und Fischbach, 1995; Loeb et al., 1999) und das Protein damit in der extrazellulären Matrix (ECM) verankern. Potentielle Bindungspartner der Ig-ähnlichen Domäne sind Agrin und Cerebroglycan (Loeb et al., 1999). Die Neureguline der Typen-I und -II können im Anschluß an die gemeinsame Ig-ähnliche Domäne eine Glykosylierungssequenz beinhalten, die in den exklusiv im Nervensystem exprimierten, zum Typ-I gehörenden ARIA-Isoformen fehlt.

Der N-Terminus des Typs-III (SMDF) unterscheidet sich völlig von dem der anderen beiden Typen. Er umfaßt eine Cystein-reiche Sequenz, die als Transmembrandomäne diskutiert wird (Schroering und Carey, 1998). Dadurch erhielten Neureguline des Typs-III eine Orientierung, die konträr zu der der anderen Neuregulin-1-Varianten ist, aber ebenfalls zu einer extrazellulären Exposition der EGF-ähnlichen Domäne führt. Außerdem könnten durch diese N-terminale Membranverankerung auch solche Isoformen, die die juxtamembranen Spleißvarianten 3 oder 5 besitzen (siehe unten), membrangebunden auftreten.

Allen Neuregulin-1 Produkten gemeinsam ist die hochkonservierte EGF-ähnliche Domäne, die bei Typ-I und -II an die Ig-ähnliche oder die Glykosylierungsdomäne, bei Typ-III unmittelbar an den spezifischen N-Terminus anschließt. Die EGF-ähnliche Domäne enthält sechs Cystein-Reste, die durch die Ausbildung von drei Disulfid-Brücken zu drei Schleifen in der Proteinstruktur führen. Die Sequenz der EGF-ähnlichen Domäne aller Neuregulin-1 Produkte ist bis zum 5. Cystein-Rest identisch, an dem eine alternative Spleißstelle beginnt. Durch diese werden α - und β -Isoformen definiert. Die Neuregulin-1 α -Isoformen werden meist als mesenchymale Varianten des Proteins diskutiert, während die β -Isoformen als die neuronalen Varianten gelten (Meyer und Birchmeier, 1994; Wen et al., 1999). Direkt an die EGF-ähnliche Domäne schließt sich die Juxtamembrandomäne an, die



ebenfalls alternative Spleißstellen enthält. Hier sind fünf verschiedene Varianten möglich (1 bis 5). Die Juxtamembrandomäne mit ihren verschiedenen Isoformen beinhaltet wahrscheinlich Signalsequenzen, die die proteolytische Spaltung des Proteins beeinflussen und somit das Verbleiben einer Neuregulin-1 Isoform in der Membran oder die Abspaltung als extrazelluläres Protein steuern. Zwei der fünf Juxtamembran-Spleißvarianten (3 und 5) besitzen ein Stop-Codon, kodieren also verkürzte Proteine. In den restlichen Isoformen folgt der spleißspezifischen Sequenz ein gemeinsamer Teil der Juxtamembrandomäne, eine Transmembrandomäne, sowie eine cytoplasmatische, die in ihrem C-terminalen Bereich wiederum alternative Spleißstellen enthält. Durch sie werden die Neuregulin-1 Isoformen a, b und c definiert. Die hochkonservierte cytoplasmatische Domäne enthält Signalsequenzen, die ebenfalls die proteolytische Spaltung der Neuregulin-1 Proteine beeinflussen (Liu et al., 1998a; Liu et al., 1998b). Außerdem wird diskutiert, ob die cytoplasmatischen Isoformen spleißspezifisch an das Zytoskelett oder andere intrazelluläre Elemente binden.

Einige wenige distinkte Neuregulin-1 Isoformen, also Kombinationen der verschiedenen Typen und spleißspezifischen Varianten, konnten bereits im Säugerorganismus nachgewiesen werden. Ob noch zusätzliche Isoformen zusätzlich exprimiert werden und welche das sind, ist noch nicht bekannt. Ebenso beginnt man erst zu untersuchen wieviele und welche Neuregulin-1 Isoformen im sich entwickelnden, bzw. im adulten ZNS vorkommen, wobei es Hinweise auf verschiedene Typen und Isoformen in unterschiedlichen Regionen des embryonalen Nervensystems gibt (Meyer und Birchmeier, 1994; Sandrock et al., 1995; Meyer et al., 1997; Rimer et al., 1998). Eine ungeklärte Frage ist auch, wie die Steuerung des alternativen Spleißens von Neuregulin-1 erfolgt, d. h. ob die Expression unterschiedlicher Isoformen in erster Linie durch extrazelluläre oder intrazelluläre Signale reguliert wird. Insgesamt sind für die Neuregulin-1-Regulierung eine Vielzahl von Faktoren bekannt. Zu diesen gehören einerseits neurotrophe Faktoren wie NT-3/-4, BDNF und GDNF (Loeb und Fischbach, 1997), andererseits Transkriptionsfaktoren wie die Homeobox-Proteine islet-1 und -2 (Loeb et al., 1999). Autoregulatorische Mechanismen scheinen ebenfalls an der Kontrolle der



Neuregulin-Expression beteiligt zu sein, da nicht nur NT-3 die Neuregulin-1 Expression, sondern auch Neuregulin-1 die NT-3-Expression beeinflusst.

1.1.2 ErbB-Rezeptor Tyrosinkinasen

Die erbB-Tyrosinkinasen, Mitglieder der EGF-Rezeptorfamilie, stellen die Rezeptoren der Neureguline dar. Zwei der vier erbB-Rezeptoren sind auch unter anderen Namen bekannt, erbB-1 als EGF-Rezeptor, erbB-2 als her/neu (Peles und Yarden, 1993; Lemke, 1996; Gassmann und Lemke, 1997; Burden und Yarden, 1997). ErbB-Rezeptor Tyrosinkinasen besitzen eine extrazelluläre Liganden-Bindungsstelle, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne mit Phosphorylierungsstellen und Kinase-Aktivität. Die Tyrosinkinase erbB-2 bindet allerdings keinen der EGF-ähnlichen Faktoren mit hoher Affinität (Horan et al., 1995; Tzahar et al., 1997), und erbB-3 fehlt die Kinase-Aktivität (Guy et al., 1994). Da die Rezeptoren jedoch, wahrscheinlich durch die Liganden-Bindung ausgelöst, dimerisieren (Tzahar et al., 1997), und nur Dimere die Signaltransduktion auslösen, stellen auch diese beiden unvollständigen Proteine wichtige Familienmitglieder dar. Generell können alle Homo- und Heterodimere gebildet werden. Allerdings können erbB-2-Homodimere keine Liganden binden und somit nicht aktiviert werden, und erbB-3-Homodimere können aufgrund der fehlenden Kinase-Aktivität trotz erfolgreicher Ligandenbindung keine Signale weiterleiten (Tzahar et al., 1997). Meist sind Heterodimere potenter als Homodimere, besonders wenn sie erbB-2 als eine Untereinheit enthalten. Denn erbB-2 verlangsamt die Dissoziationsrate der Heterodimere und verlängert somit die Zeit der Rezeptoraktivierung und Signaltransduktion (Karunakaran et al., 1996).

Welches erbB-Dimer gebunden und aktiviert wird, ist nicht nur von dem jeweiligen Neuregulin-Gen, sondern auch von der Isoform des Proteins abhängig. Die Produkte verschiedener Neuregulin-Gene binden an unterschiedliche Sets von erbB-Rezeptoren, Neuregulin-1 und -2 *in vitro* an alle vier erbB-Rezeptoren (Pinkas-Kramarski et al., 1998), wobei Neuregulin-1 wahrscheinlich *in vivo* nur an erbB-2, erbB-3 und erbB-4 bindet (Pinkas-Kramarski et al., 1996a; Pinkas-Kramarski et al., 1996b; Alroy und Yarden, 1997; Jones et al., 1999). Neuregulin-3 bindet ebenfalls die Tyrosinkinasen erbB-2, erbB-3 und erbB-4 (Zhang et al.,



1997), während Neuregulin-4 ausschließlich erbB-4-Homodimere aktiviert (Harari et al., 1999). Die verschiedenen Produkte eines einzelnen Neuregulin-Gens binden unterschiedliche Homo- und Heterodimere desselben Rezeptorsets mit unterschiedlichen Affinitäten.

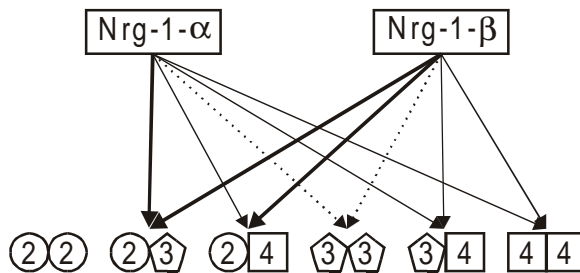


Abb. 1.2 Die beiden Neuregulin-1 α - und β -Isoformen binden mit unterschiedlichen Affinitäten an die verschiedenen erbB-Rezeptordimere (symbolisiert durch die Ziffern 2, 3 und 4). An erbB-2 Homodimere bindet kein Neuregulin mit hoher Affinität, erbB-3 Homodimere binden Neureguline, werden jedoch nicht aktiviert (durchbrochene Pfeile). Dünne Linien stellen geringere Bindungsaffinitäten dar, dicke Linien hohe Affinitäten. (Nach Pinkas-Kramarski et al., 1998, verändert.)

stellen geringere Bindungsaffinitäten dar, dicke Linien hohe Affinitäten. (Nach Pinkas-Kramarski et al., 1998, verändert.)

Außer den Neuregulinen binden auch noch verschiedene andere Proteine, die eine EGF-ähnliche Domäne besitzen, an die erbB-Rezeptor Tyrosinkinase, z. B. TGF- α , β -Cellulin und Epiregulin (Shelly et al., 1998; Jones et al., 1999). Die verschiedenen EGF-ähnlichen Faktoren und die vier erbB-Rezeptor Tyrosinkinase bilden ein komplexes Signaltransduktions-Netzwerk (Alroy und Yarden, 1997; Pinkas-Kramarski et al., 1998), das in der embryonalen und postnatalen Entwicklung, der Tumorgenese und wahrscheinlich auch in der Aufrechterhaltung der Funktion adulter Organe eine entscheidende Rolle spielt. Im Zusammenhang der Tumor-Entstehung gilt dem Oncogen erbB-2 eine besondere Aufmerksamkeit in der klinischen Forschung, da es in ungefähr 25 % aller Brustkrebsfälle, und auch in einigen anderen Tumoren überexprimiert wird (Alroy und Yarden, 1997). Die Hemmung dieses Rezeptors mittels spezifischer Antikörper bildet einen Ansatzpunkt zur Krebsbekämpfung, der mittlerweile vor allem in der Brustkrebs-Therapie genutzt wird.

1.1.3 Funktionen des Neuregulin-1-erbB Signalnetzwerks

Die bisher bekannten Funktionen von Neuregulin-1 stehen zumeist im Zusammenhang mit der embryonalen oder postnatalen Entwicklung mesenchymaler und neuraler Gewebe. Im entstehenden Zentral-Nervensystem (ZNS) beeinflusst



Neureguline-1 das Überleben, die Proliferation, die Differenzierung und die Reifung von Astrozyten und Oligodendrozyten bzw. deren Vorläuferzellen (Pinkas-Kramarski et al., 1994; Canoll et al., 1996; Rio et al., 1997; Vartanian et al., 1999). Sowohl Oligodendrozyten-Typ-II Vorläuferzellen als auch reife Oligodendrozyten exprimieren die Tyrosinkinasen erbB-2 und erbB-4 (Vartanian et al., 1997). Rekombinantes Neuregulin-1 (rhGGF2) induziert eine verstärkte Remyelinisierung zentraler Läsionen in einem Tiermodell für multiple Sklerose (Cannella et al., 1998). Diese Befunde in Kombination mit der erbB-Expression in adulten Oligodendrozyten weisen auf eine Beteiligung von Neuregulinen an der Aufrechterhaltung und nicht nur an der Entwicklung des Zentral-Nervensystems hin. Während der Bildung des Kleinhirns sind Neuregulin-erbB Wechselwirkungen für die Migration von Körnerzellen aus der externen in die interne Körnerzellschicht essentiell (Rio et al., 1997). Auch in der Kortex-Entwicklung fördert Neuregulin-1 die neuronale Migration und die Verlängerung und Aufrechterhaltung radiärer Gliazellen, wobei wahrscheinlich autokrine Mechanismen auf die migrierenden Neurone wirken, da sie selber Neuregulin-1 exprimieren (Anton et al., 1997). Ferner ist Neuregulin-1 ein neurotropher Faktor, der an der Differenzierung retinaler Ganglienzellen beteiligt ist (Bermingham-McDonogh et al., 1996; Zhao und Lemke, 1998). In sensorischen und motorischen Neuronen des Rückenmarks können Neuregulin-1 mRNA und Protein bereits kurz nach der Entstehung dieser Zellen detektiert werden. Extrazelluläres, im Laufe der Entwicklung zunehmendes Neuregulin-Signal erscheint entlang früher motorischer, sensorischer und Rückenmarks-Axone. Die Akkumulation in der ECM entlang dieser Strukturen findet zumindest teilweise durch die Bindung an Heparansulfat-Proteoglykane statt (Loeb et al., 1999), was auf eine Beteiligung von Neuregulinen der Typen-I und-II hinweist. Später in der Entwicklung akkumuliert Neuregulin-1 Protein auch in der Basalmembran der neuromuskulären Endplatten (Loeb et al., 1999). Neuere Studien an einer Neuregulin-1 Typ-III Null-Mutante konnten jetzt zeigen, daß für die Bildung und Aufrechterhaltung neuromuskulärer Endplatten - zumindest bis zur Geburt - dieser Typ notwendig ist (Wolpowitz et al., 2000). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß auch die anderen beiden Neuregulin-1 Typen in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen. In der postsynaptischen Membran neuromuskulärer Verbindungen konnte eine Häufung von erbB-Rezeptor Tyrosin-



kinasen detektiert werden (Moscoso et al., 1995), durch die das Neuregulin-Signal in die Muskelzellen weitergeleitet wird und hier u. a. die Expression adulter Acetylcholin-Rezeptor-Untereinheiten und spannungsabhängiger Natrium-Kanäle fördert.

Außerdem gibt es Hinweise darauf, daß Neuregulin-1-erbB Interaktionen in den sogenannten "community effect" involviert sind (Kim et al., 1999). Dieser Effekt beschreibt die Fusion von Myoblasten zu mehrkernigen Muskelfasern.

Im peripheren Nervensystem determiniert Neuregulin-1 außerdem das gliale Schicksal von Neuralleisten-Zellen, fördert das Überleben von Schwann-Zell-Vorläufern und stimuliert die Proliferation von Schwann-Zellen (Shah et al., 1994; Vartanian et al., 1997; Vartanian et al., 1999). Der Erhalt der Schwann-Zellen entlang peripherer Axone ist abhängig von axonalem Neuregulin-1 Typ-III. Fehlt dieses Neuregulin, proliferieren die Schwann-Zellen entlang der Axone zunächst normal, sterben aber bald ab und fehlen in späteren Entwicklungsstadien völlig (Wolpowitz et al., 2000).

Aber auch außerhalb des Nervensystems spielen Neureguline in der Entwicklung eine entscheidende Rolle. Neuregulin-1 Isoformen, die die Ig-ähnliche Domäne enthalten, sind maßgeblich an der Entwicklung des Herzens (Zhao und Lemke, 1998), sowie an der gesamten Angiogenese beteiligt (Hanahan, 1997). In Knockout-Mäusen, denen diese Neureguline fehlen, ist weder das Herz voll ausgebildet noch das Blutgefäßsystem geschlossen, weshalb die Embryonen vor dem Tag E11 sterben (Kramer et al., 1996).

Viele Funktionen für Neuregulin-1-erbB-Wechselwirkungen in der embryonalen und postnatalen Entwicklung des Organismus wurden während der letzten Jahre gefunden und untersucht. Außerdem mehren sich die Hinweise, daß diese Wechselwirkungen auch im adulten Gehirn Aufgaben besitzen müssen. Denn sowohl Neuregulin-1 als auch seine Rezeptoren werden von verschiedenen Zellen des adulten ZNS exprimiert, zum Teil abhängig von neuronaler Aktivität (Eilam et al., 1998) oder Krankheit, bzw. Verletzung (Cannella et al., 1998). Um jedoch mehr über Neuregulin-1-erbB Interaktionen im adulten Gehirn, und auch über die möglicherweise vorhandene Korrelation der funktionellen Diversität mit der



strukturellen Diversität des Proteins zu erfahren, ist es nötig, die Expressionsmuster verschiedener Neuregulin-1 Isoformen und erbB-Rezeptoren zu analysieren.

1.2 Regeneration des Fazialisnervs nach einer peripheren Läsion

Wird das Säuger-ZNS verletzt, findet eine Reihe an Vorgängen statt, die mit Wundverschluß, Narbenbildung und gegebenenfalls Regeneration in engem Zusammenhang stehen. Dieser letzte Aspekt kommt dann zum Tragen, wenn einer der Hirnnerven verletzt wird, deren Neurone zu einem erneuten Axonwachstum befähigt sind, wenn sie einen entsprechenden Stimulus, z. B. vom Narbengewebe der Läsionsstelle, erhalten (Richardson et al., 1980; Benfey und Aguayo, 1982). Bei den Hirnnerven liegen die Kerngebiete im ZNS, meist im Hirnstamm, die Axone dagegen ziehen in die Peripherie. Bei einer peripheren Durchtrennung eines Hirnnervs ändern sich nicht nur Morphologie, Funktion und Genexpression der Zellen an der Läsionsstelle und weiter in Richtung des deprivierten Zielgewebes, retrograde Reaktionen sind auch im entsprechenden Kerngebiet des ZNS zu beobachten. Bereits 1892 beschrieb Franz Nissl einen Teil dieser retrograden Reaktionen, von ihm als Chromatolyse bezeichnet, die im Fazialiskern nach einer peripheren Läsion des Nervus facialis zu beobachten sind. Inzwischen stellt die Fazialisaxotomie ein auf morphologischer wie molekularer Ebene gut untersuchtes Beispiel einer Hirnnervenläsion mit folgender Regeneration dar (Kreutzberg, 1966; Tetzlaff et al., 1986; Kreutzberg et al., 1989; Kreutzberg, 1993; Schwaiger et al., 1998).

Die periphere Läsion des Fazialisnervs führt zu retrograden Reaktionen, zu denen neuronale Dedifferenzierung und Axonwachstum ebenso gehören wie gliale Proliferation, Migration und Differenzierung. Infolge der Läsion und der dadurch hervorgerufenen Streßsituation ist zunächst ein Anstieg der Stoffwechselrate der axotomierten Motoneurone zu beobachten. Außerdem verringert sich die Expressionsrate von Proteinen, die mit der synaptischen Übertragung oder der Stabilisierung der neuromuskulären Endplatte im Zusammenhang stehen (Kreutzberg et al., 1984; Hol et al., 1999). Im Gegensatz dazu nimmt die Expression solcher Proteine zu, die in das erneute Auswachsen der Axone



involviert sind, z. B. strukturelle Proteine wie Zytoskelettkomponenten (Tetzlaff et al., 1988). In Bezug auf gliale Zellen ist eine Reihe von Reaktionen zu beobachten. Zunächst findet eine starke Proliferation und Einwanderung von Mikroglia in den Fazialiskern statt (Cammermeyer, 1965; Kreutzberg, 1966; Friede und Johnstone, 1967), die sich in den synaptischen Spalt der Synapsen auf den Perikaryen und austretenden Axonen der verletzten Motoneurone schiebt. Dieser als „synaptic stripping“ bezeichnete Vorgang deafferentiert die axotomierten Neurone zu ca. 80 % (Blinzinger und Kreutzberg, 1968). Ihm folgt die Umhüllung der Neurone durch astrozytäre Lamellen. Astrozyten unterliegen infolge der Läsion keiner Proliferation (Graeber et al., 1988), werden aber zunächst hypertroph und ändern ihre Morphologie, was mit einer verstärkten Synthese des glialen fibrillären sauren Proteins (GFAP, glial fibrillary acidic protein) einhergeht (Tetzlaff et al., 1988). Dieses wird als frühe astrozytäre Reaktion von der als verzögerte astrozytäre Reaktion bezeichneten Lamellenbildung unterschieden (Graeber und Kreutzberg, 1988; Graeber und Kreutzberg, 1990). Die synaptische Isolation der neuronalen Zellkörper durch astrozytäre Lamellen bleibt auch noch nach einer erfolgten Re-Innervation des Zielgewebes bestehen. Möglicherweise ist dieses einer der Gründe dafür, daß die Regeneration nur unvollständig erfolgt, die Feinmotorik nie zurückerlangt wird. Das Fehlen des synaptischen Eingangs an den Perikaryen der axotomierten Motoneurone verändert möglicherweise die Integration und Reizweiterleitung, und verhindert so die vollständige Regeneration. Während der Regeneration rekapitulieren die Neurone teilweise das embryonale Programm, das das Auswachsen der Axone und die Zielfindung bestimmt (Aubert et al., 1995). Einige Neuregulin-1 Isoformen sind wahrscheinlich Teil dieses Programms (Lemke, 1996; Meyer et al., 1997; Loeb et al., 1999; Wolpowitz et al., 2000). Somit bietet die Regeneration nicht nur eine Möglichkeit zu erfahren, welche Isoformen an den regenerativen Prozessen selber beteiligt sind, sondern auch, welche während des Axonwachstums in der Embryogenese notwendig sein könnten. Außerdem dürfte die Beobachtung der isoformspezifischen, quantitativen und qualitativen Änderungen der Neuregulin-1 Expression Rückschlüsse auf die verschiedenen Funktionen distinkter Neuregulin-Isoformen im intakten bzw. im verletzten und regenerierenden ZNS ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere und Gewebsgewinnung

Für alle Tierexperimente wurden erwachsene, männliche Ratten des Stammes Wistar aus der Zucht des MPI für Biochemie benutzt. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen mit Standardfutter unter künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus (je 12 Std.) gehalten.

2.1.1 Operation

Um die zellulären und molekularen Reaktionen der Fazialisneurone und der sie umgebenden Gliazellen untersuchen zu können, wurde bei männlichen Wistar-Ratten einseitig eine Fazialistransection durchgeführt. Der Fazialiskern der unverletzten kontralateralen Seite wurde als interne Kontrolle verwendet und identisch wie der operierte ipsilaterale behandelt.

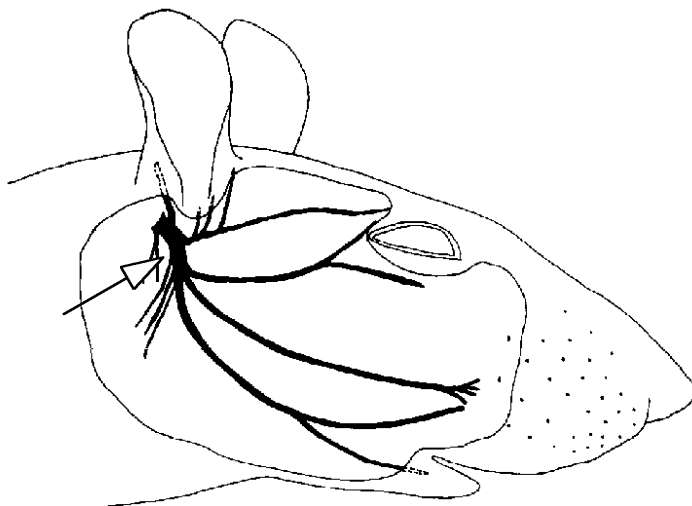


Abb. 2.1 Schematische Darstellung des Verlaufs des Nervus facialis der Ratte nach Austritt aus dem Foramen stylomastoideum. Der Pfeil markiert die Stelle, an der der Nerv für die Untersuchungen durchtrennt wurde.

Um die Fazialistransection durchzuführen, wurden die Versuchstiere mit Äther narkotisiert und ihr rechter Fazialisnerv freigelegt. Kurz außerhalb des Foramens stylomastoideum wurden die beiden hier sichtbaren Zweige des Nervs, die zum Augenlid bzw. zum Feld der Vibrissen-Insertion führen, durchtrennt. Anschließend wurden die Wundränder zusammengedrückt und mit Klammern verschlossen.



Nach einer erfolgreichen Operation konnten die Tiere die Vibrissen der ipsilateralen Seite nicht mehr bewegen. Je nach Experiment wurden die Tiere vor der Tötung weitere 1, 3, 5, 7, 14, 28 oder 56 Tage unter Standardbedingungen gehalten.

2.1.2 Tötung der Tiere

Je nach Verwendungszweck wurden die Tiere direkt getötet oder mit Paraformaldehyd (PFA) perfundiert. Unperfundierte Gehirne wurden für Westernblot-Analysen, RNA-Gewinnung und Immunhistochemie verwendet, perfundierte Gehirne für *In-situ*-Hybridisierung.

Für die Hirnentnahme ohne vorherige Perfusion wurden die Tiere mit Äther getötet, das Gehirn entnommen und in Isopentan auf flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Tieren, die zur Perfusion bestimmt waren, wurde 1 ml 30 %iges Chloralhydrat intraperitoneal injiziert. Wenn keine Reflexe mehr feststellbar waren, wurde der Brustraum geöffnet und mit einer Kanüle durch den linken Herzventrikel für 3 Min. mit isotoner Kochsalzlösung oder PBS (0,1 M) perfundiert, um das Blut zu entfernen. Anschließend wurde das Tier mittels Durchfluß von ca. 250 ml 4 %igem PFA in PBS für 10 Min. fixiert. Nach Entnahme des Gehirns wurde dieses in 4 % PFA in PBS für 1 Std. auf Eis nachfixiert, über Nacht bei 4 °C in 15 % Sucrose inkubiert, um eine Schädigung des Gewebes beim Einfrieren zu verhindern. Das Einfrieren selbst erfolgte wie oben beschrieben.

2.1.3 Beschichtung von Objektträgern

Für *In-Situ*-Hybridisierung wurden Gewebeschnitte auf RNase-freien, silanisierten Objektträgern aufgezogen. Dazu wurden die Objektträger für 4 Std. bei 200 °C sterilisiert, bevor sie in Azeton gewaschen, an der Luft getrocknet, in Azeton mit 2,5 % 3-Aminotriethoxysilan (Sigma, Deisenhofen) beschichtet und zweimal in Wasser gewaschen wurden. Jeder dieser Schritte erfolgte für 5 Min. bei Raumtemperatur. Die Objektträger wurden bei 50 °C im Wärmeschränk getrocknet und dann bei Raumtemperatur aufgehoben. Um Schnitte für Immunhistochemie aufzuheben, wurden die hierfür bestimmten Objektträger in Chromgelatine getaucht und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.



2.1.4 Herstellung von Gefrierschnitten

Für Immunhistochemie und *In-Situ*-Hybridisierung wurden die 20 µm Gehirnschnitte auf einem Jung-Frigocut 2700 (Leica, Bensheim) angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Für Gehirne, die ausschließlich für Immunhistochemie bestimmt waren, wurden chromgelatinebeschichtete Objektträger verwendet, für alle anderen silanisierte Objektträger. Die genaue Lokalisierung der gewünschten Hirnstrukturen wurde mittels Hämalaun-Färbung von Probeschnitten unter einem Binokular überprüft.

2.1.5 Ausstanzen von Fazialiskernen

Für den Vergleich der mRNA- und Proteinexpression im Fazialiskern der operierten und der unoperierten Seite wurden die Kerngebiete aus dem Hirnstamm unfixierter, gefrorener Hirne ausgestanzt. Hierzu wurde ein Hohlrohr mit 1 mm Durchmesser und 2 mm Länge verwendet. Das Gehirn wurde mit dem Kryostat bis zum Auftauchen der ersten Fazialisneurone getrimmt, das Kerngebiet ausgestanzt und das entnommene Gewebe der operierten und der unbehandelten Seite in jeweils ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Je nach Verwendungszweck wurden bis zu 3 Fazialiskerne einer Seite zusammengegeben.

2.2 Zellkulturen

Alle Zellen, die als akut isolierte Zellen verwendet oder in Kultur genommen wurden, stammten von Wistar-Ratten der institutseigenen Zucht. Die Tiere wurden, ebenso wie die für die Tierversuche verwendeten, unter Standard-Laborbedingungen in künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus (je 12 Std.) gehalten.

2.2.1 Gliale Kulturen

Um gliale Primärkulturen anzusetzen, wurden die beiden Großhirnhälften neugeborener Ratten entnommen, die Meningen entfernt und das Hirngewebe in 1,5 ml Astrozytenmedium durch Zerreiben mit einer sterilen Pasteurpipette homogenisiert. Die Zellsuspension wurde mit Astrozytenmedium auf 10 ml aufgefüllt, über einen 30 µm-Filter von aggregierten Geweberesten befreit und in PEI-beschichteten Flaschen (0,3 % Polyethylenin in Boratpuffer, pH 8,4 über Nacht inkubiert; Sigma, Deisenhofen) kultiviert. Die Astrozyten hefteten sich auf dem



Flaschenboden an und wuchsen zu einem dichten Rasen, auf dem sich wiederum die Mikroglia festsetzte. Nach sieben Tagen wurde das Medium zum ersten Mal gewechselt, danach erneut nach vier Tagen. Vor diesem Wechsel wurden die Kulturen für 30 Min. im Brutschrank geschüttelt (200/Min.), um alte und kranke Mikrogliazellen zu entfernen. Nach weiteren vier Tagen konnten die kombinierten Glia-Kulturen in Mikroglia-angereicherte bzw. Astrozyten-angereicherte Kulturen getrennt werden. Dazu wurde die Mikroglia vom Astrozytenrasen abgeschüttelt, indem die Flaschen auf dem Schüttler im Brutschrank 1,5 Std. lang 200 mal/Min. geschüttelt wurde. Das Medium mit den abgelösten Mikrogliazellen wurde abgenommen, für 5 Min. bei 12.000 rpm zentrifugiert, in 10 ml frischem DEMEM (Gibco Life Technologies, Rockville, USA) mit 15 % FCS (Biochrom, Berlin) in neue, unbeschichtete Kulturflaschen überführt. Nach zwei weiteren Tagen in Kultur wurde die Mikroglia geerntet und zur RNA-Isolation verwendet, während die Astrozyten noch für zwei Wochen kultiviert wurden.

2.2.1.1 Aufreinigung von Astrozyten-angereicherten Kulturen

Um reine (>99 %) Astrozytenkulturen für die RNA-Isolation zu erhalten, wurden die Zellen von kontaminierenden Fibroblasten mittels Dynabeads (Dyna, Hamburg) befreit. Dazu wurde das Medium entfernt, 100 µl Trypsin (0,25 % in PBS; Gibco Life Technologies, Rockville, USA) zugegeben, 15 Min. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und die Ablösung der Zellen dann durch Zugabe von 100 µl Astrozytenmedium gestoppt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in PBS (Phosphate buffered saline) aufgenommen und mit anti-Fibroblasten-Antikörper (Dianova, Hamburg) versetzt. Die Antikörperbindung an die Fibroblasten fand auf dem Drehrad bei 4 °C für 30 Min. statt. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, in PBS aufgenommen und mit pan-anti-Maus-Antikörpern gekoppelten Dynabeads (Dyna, Hamburg) versetzt. Nach erneuter Inkubation (wie oben beschrieben) wurden die Reaktionsgefäße in einen Magneten gestellt, wodurch sich die an die Dynabeads adsorbierten Fibroblasten an der Gefäßrückwand anlagerten. Die reine Astrozytensuspension konnte ohne Mitnahme der Fibroblasten aus dem Gefäß entnommen werden.



2.2.2 Substantia nigra Neurone

Um Zellkulturen zu erhalten, die mit dopaminergen Neuronen der Substantia nigra angereichert sind, wurden die Substantia nigra aus E13-Embryonen entnommen, von Meningen und übrigem Gewebe befreit und in 5 ml Saline I aufgefangen. Die Saline I wurde abpipettiert und durch 4 ml physiologische NaCl-Lösung ersetzt, in der das Gewebe mit der Schere zerkleinert wurde. Nach erneuter Zugabe von 4 ml NaCl-Lösung wurde das Gewebe samt Kochsalzlösung in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, 2 ml Trypsin (0,25 % in PBS; Gibco Life Technologies, Rockville, USA) zugegeben und bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (200/Min.) inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 ml Substantia-nigra-Medium gestoppt und das Gewebe anschließend durch Zerreiben mit einer 10 ml-Pipette dissoziiert. Nachdem die Gewebereste sich abgesetzt hatten, wurde der Überstand über einen 120 µm-Filter aufgereinigt und die Suspension vereinzelter Zellen in einem frischen 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die abgesetzten Gewebereste wurden erneut mit 5 ml Substantia-nigra-Medium versetzt, mit einer 5 ml-Pipette zerrieben und der Überstand nach Filtration mit der Zellsuspension vereinigt. Mit den noch verbliebenen Resten wurde erneut wie beschrieben verfahren, nachdem 1 ml Substantia-nigra-Medium zugegeben worden war. Die gesammelte Zellsuspension wurde dann für 5 Min. bei 12.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in Medium aufgenommen, dissoziiert und auf 10 ml mit Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden anschließend in Poly-L-Lysin/Laminin-beschichteten Kulturgefäßen (0,1 mg/ml Poly-L-Lysin über Nacht, 0,5 µg/ml Laminin für 4 Std., mit Saline I waschen) für circa fünf Tage kultiviert, bevor sie geerntet werden konnten.

2.2.3 Akute Motoneurone

Motoneurone wurden aus dem Rückenmark von E15-Embryonen gewonnen. Dazu wurde das Rückenmark der Tiere entnommen und in 5 ml Lösung-1 auf Eis aufgefangen. Nach Austausch der Lösung (erneut 5 ml Lösung-1) wurden die Rückenmarksstränge in je 8-10 Stücke zerteilt, nochmals 2 ml Lösung-1 zugegeben, alles zusammen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 2 ml Trypsin (0,05 % in Lösung 1; Gibco Life Technologies, Rockville, USA) bei 37 °C



inkubiert. Nach 15 Min. wurde der Verdau durch die Zugabe von Trypsin-Inhibitor (Sigma, Deisenhofen) gestoppt. Die verbliebenen Gewebestücke wurden vorsichtig trituriert, bevor bei 300 g für 15 Min. zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde in 1 ml DMEM-H (Gibco Life Technologies, Rockville, USA) und 0,5 ml Lösung 1 erneut trituriert, unter Verwendung einer feuerpolierten, silikonisierten Pipette. Die Zellsuspension wurde über einen 60 µm-Filter aufgereinigt und mit DMEM-H auf 10 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 2 ml 4 % BSA in DMEM-H wurde für 10 Min. bei 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 2 ml DMEM-H aufgenommen, die Suspension zu 2 ml Metrizamid (7 %) in DMEM-H gegeben und für 15 Min. bei 300 g zentrifugiert, wobei die Zentrifuge am Ende langsam auslief und nicht abgebremst wurde. Die Motoneurone befanden sich nach diese Dichtegradientenzentrifugation in der Zwischenphase, konnten aus dieser mit Hilfe einer Pasteurpipette entnommen und in DMEM-H aufgenommen werden. Nach erneuter Zentrifugation wurden sie dann ohne weitere Kultivierung für die RNA-Isolation verwendet.

2.3 Immunhistochemische Detektion von Proteinen

Proteine können im Gewebe oder in Zellkulturen durch Bindung eines spezifischen Antikörpers in ihrer zellulären oder subzellulären Verteilung untersucht werden. Die Detektion des gebundenen primären Antikörpers kann über indirekte Immunfluoreszenz erfolgen.

2.3.1 Immunhistochemie

Unfixierte Gewebeschnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, getrocknet und für 10 Min. in 4 % PFA in PBS fixiert. Anschließend wurden sie in 1x PBS gewaschen, 10 Min. in 50 %igem Äthanol permeabilisiert und erneut gewaschen. Die Schnitte wurden mit einem anti-pan-Neuregulin-1-Antikörper (1:200 in PBS/BSA/Natriumazid; NeoLab, Union City, USA) über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Antikörper ist, laut Herstellerangaben, gegen die EGF-ähnliche Domäne des Proteins gerichtet und erkennt alle Neuregulin-1 Isoformen. Nach Waschen der Schnitte in PBS wurde der sekundäre Cy3-gekoppelte Antikörper (1:400; Dianova, Hamburg) aufgetragen und für 3 Std. bei



Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Diese Exposition fand im Dunkeln statt, um das Bleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu reduzieren. Im Anschluß an erneutes Waschen wurden die Schnitte mit einem astrozytären Marker doppelmarkiert. Ein gegen das gliale fibrilläre saure Protein (glial fibrillary acidic protein = GFAP) gerichteter Antikörper (1:400; Sigma, Deisenhofen) wurde wiederum für 3 Std. bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert und mit einem DTAF-konjugierten sekundären Antikörper (1:200; Dianova, Hamburg) visualisiert. Nach gründlichem Waschen wurden die Schnitte mit Fluormount Medium (ICN Biomedical, Aurora, USA) eingedeckt.

2.3.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die Detektion der indirekten Immunfluoreszenz und Aufnahme von Bildern erfolgte mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS 4D (Leica, Heidelberg) auf einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Leica, Heidelberg). Bei einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop regt ein Laser die Fluorophore an jedem Punkt des ausgewählten Bildabschnitts in x, y und z-Richtung mit Licht einer definierten Wellenlänge an. Eine Photozelle mißt die von jedem dieser Punkte ausgesandte Emission und ein Rechner setzt die Emissionsintensitäten aller Punkte einer Ebene zu einem Schwarz/weiß-Bild zusammen. Da die optische Schichtdicke eines einzelnen Scans sehr gering ist, besteht eine Aufnahme mit einem konfokalen Mikroskop meist aus mehreren Einzelaufnahmen in z-Richtung. Diese werden dann weiterbearbeitet. Bei den Aufnahmen von Doppelmarkierungen wurden die rote und grüne Fluoreszenz getrennt voneinander aufgenommen. Von allen Einzelaufnahmen eines Fluoreszenzkanals wurden Maximale-Intensität-Projektionen erstellt. Das bedeutet, daß jeder Bildpunkt der Projektion demjenigen Einzelbild entnommen wurde, das an diesem Punkt die höchste Helligkeit aufwies. Zur weiteren Bearbeitung der projizierten konfokalen Aufnahmen wurden die Programme Photopaint und Corel-Draw (Corel, Ottawa, Kanada) verwendet. Zusammengehörende Bilder, die die Veränderung von Proteinexpressionen zeigen sollten, wurden jeweils unter identischen Bedingungen aufgenommen und weiterverarbeitet.



2.4 Westernblot

Eine andere Methode zur Untersuchung von Proteinen stellt der Immuno- oder Westernblot dar, mit dem die Größe und Expression von Proteinen in Geweben analysiert werden können. Hierzu werden denaturierte Proteine aus Zell- oder Gewebslysaten elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und das zu untersuchende Protein mit einem Antikörper markiert. Die Detektion erfolgt beispielsweise über einen sekundären Enzym-gekoppelten Antikörper und die enzymatische Umsetzung von Farbstoffen oder die Erzeugung von Chemolumineszenz.

2.4.1 Tritonlyse von Zellen und Geweben

Zur Proteingewinnung für Westernblot-Analysen wurden mit PBS gewaschene Zellkulturen und unbehandelte Gehirne verwendet. Die Zellen (3-8 Mio.) oder Gewebestücke (10-50 mg) wurden mit 100 – 500 µl eiskaltem Tritonlysepuffer versetzt, mit einem Dystroy-S-Kunststoffhomogenisator (Biozym, Mannheim) zerkleinert und für 10 - 30 Min. auf Eis gestellt, um die chemische Lyse der mechanisch zerkleinerten Zellen und Gewebe zu vervollständigen. Die Homogenisate wurden dann 15 Min. bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand, in dem die Proteine gelöst waren, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Die Proteinkonzentration der Überstände wurde mittels Bradford-Methode spektrometrisch bestimmt, indem 5 µl Proteinlösung, 995 µl H₂O und 250 µl Bradford-Reagenz (Biorad, München) zusammengegeben, gut geschüttelt und die Lösung für ca. 5 Min. bei Raumtemperatur belassen wurde. In Abhängigkeit vom Proteingehalt der Lösung konnte ein Farbumschlag von braun (niedrige Konzentration) zu tiefblau (hohe Konzentration) beobachtet werden. Die exakte Konzentration wurde durch die Extinktion der Lösungen bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt, wobei 5 µl Tritonlysepuffer in Wasser als Referenz verwendet wurden. Anhand einer Eichkurve mit standardisierten BSA-Lösungen wurde der Proteingehalt der Lösungen bestimmt. Außer Zell- oder Gewebelysaten fand in den Westernblot-Analysen auch ein rekombinantes Neuregulin-Protein (NeoMarkers, Union City, USA) Anwendung, mit dessen Hilfe die korrekte Proteinerkennung durch den Antikörper untersucht wurde.



2.4.2 SDS-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden sie durch Erhitzen (3 Min. 95 °C) in Lämmli-Puffer denaturiert und 5 - 40 µg pro Tasche eines Minigels (Höfer Pharmacia, San Francisco, USA) aufgetragen. In die erste Tasche jedes Gels wurden 10 µl eines gefärbten Protein-Längenstandards (Benchmark, Gibco Life Technologies, Rockville, USA) eingebracht, durch den die Auftrennung der Proteine im gewünschten Größenbereich bereits während der Elektrophorese beobachtet werden konnte. Für die Analyse der Neureguline, die zwischen 30 und 70 kDA groß sind, wurden Westerngele aus einem 15 %igen Polyacrylamid-Trenngel, überschichtet mit einem 3 %igen Sammelgel, eingesetzt. Die Elektrophorese wurde mit SDS-Elektrophorese-Puffer bei 100 V für ca. 3 Std. durchgeführt.

2.4.3 Übertragung der Proteine auf Membran

Nach der Elektrophorese wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF- (Immobilon-P, Millipore, Bedford, USA) oder Nitrozellulose-Membran (Protran, Schleicher und Schüll, Dassel) übertragen. Während die PVDF-Membran zunächst für 15 Sek. in Methanol aktiviert werden mußte, bevor sie in Transblot-SD-Puffer überführt werden konnte, wurde die Nitrozellulose-Membran direkt in Transblot-SD-Puffer angefeuchtet. Die Proteinübertragung wurde entweder in einem puffergefüllten Tank oder in einer halbtrockenen Apparatur zwischen zwei Grafitelektroden durchgeführt. Die Dauer des Blottens hing von der verwendeten Methode und der Größe der zu untersuchenden Proteine ab. Kleine Proteine werden schneller auf die Membran übertragen als große. Bei zu langem Blotten besteht die Gefahr, daß die Proteine durch die Membran hindurchwandern und somit nicht mehr zu detektieren sind.

2.4.3.1 Tankblot

Eine Lage Chromatographie-Papier (Whatman, Maidstone, England), das Gel, die Membran und noch ein Chromatographie-Papier wurden übereinander geschichtet und in einer Halterung eingeklemmt. Die Halterung wurde dann in den mit kaltem Transblot-SD-Puffer gefüllten Transphor-Tank (Höfer Pharmacia, San Francisco,



USA) gehängt. Die Proteinübertragung fand bei 14 V und einer Umgebungstemperatur von 4 °C über Nacht statt.

2.4.3.2 Halbtrockener Blot

8 Stücke Chromatographie-Papier und die Membran wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und in Transblot-SD-Puffer angefeuchtet. Auf die als Kathode fungierende Grafitplatte wurden 4 Lagen Whatman-Papier, das Gel, die Membran und wiederum 4 Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei aufeinander geschichtet und die Apparatur (Biorad, München) mit der zweiten, als Anode dienenden Grafitplatte geschlossen. Luftblasen innerhalb des Stapels verhindern den Stromfluß an dieser Stelle und somit die Proteinübertragung, weshalb sie vermieden werden mußten. Die Proteinübertragung wurde für 2-3 Std. bei 0,8 mA pro Quadrat-zentimeter Membran durchgeführt.

2.4.4 Kontrolle der Proteinübertragung

Zur Kontrolle der Proteinübertragung wurde zum einen überprüft, ob alle Banden des gefärbten Proteinstandards aus dem Gel auf die Membran übertragen worden waren, zum andern wurde das Gel in Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung und die Membran in Ponceau-S-Lösung gefärbt. Nach einer 10minütigen Färbung in Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung und anschließender Entfärbung mit Coomassie-Entfärber erschienen im Gel verbliebene Proteine als blau-violette Banden. Im Regelfall waren nach einer solchen Färbung des Gels nur einige hochmolekulare Banden (> 150 kDA) zu sehen, da optimale Übertragungsbedingungen für kleine Proteine gewählt worden waren.

Auf die Membran übertragene Proteine wurden nach einer 1minütigen Ponceau-S-Färbung und Entfernen der unspezifischen Hintergrundfärbung durch Wässern der Membran sichtbar. Durch längeres Wässern wurde die Farbe wieder komplett von der Membran entfernt, bevor sie zur Detektion spezifischer Proteine weiterbehandelt wurde.



2.4.5 Antikörper-Markierung von Proteinbanden

Bevor die auf der Membran fixierten Protein mit einem Antikörper markiert wurden, mußten unspezifische Bindungsmöglichkeiten für Proteine abgesättigt werden. Hierzu wurde die Membran für 1 Std. bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in 5 % Magermilchpulver (Glücksklee, Nestlé, Frankfurt a. M.) in TBST inkubiert. Nach dem Blocken wurde die Membran mit primärem anti-Neuregulin-1-Antikörper (NeoMarkers, Union City, USA), verdünnt in 2 % Magermilchpulver/TBST, für 3 Std. bei 37 °C im Wasserbad oder bei Raumtemperatur inkubiert. Den Antikörperlösungen wurde jeweils 0,1 % Natriumazid zugegeben, um Kontaminationen durch Bakterien oder Pilze bei längerer Lagerung vorzubeugen. Die Membranen wurden dann bei Raumtemperatur 30 - 60 Min. lang in 2 % Magermilchpulver/TBST gewaschen, bevor der sekundäre Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Antikörper (1:5000; New England Biolabs, Beverly, USA), ebenfalls in Magermilchpulver/TBST verdünnt, für 2 Std. bei Raumtemperatur zugegeben wurde. Nach mehrfachem Waschen der Membran in TBST wurde die Antikörperdetektion mittels enzymatisch erzeugter Chemolumineszenz durchgeführt.

2.4.6 Antikörperdetektion mittels Chemolumineszenz

Zur chemolumineszenten Detektion der Meerrettich-Peroxidase wurde das ECL (enhanced chemiluminescence)-System von Amersham Pharmacia (Freiburg) verwendet. Je 2,5 ml der beiden Komponenten des Systems wurden gemischt und nach 1 Min. auf die zu färbende Membran gegeben. Nach 1 Min. enzymatischer Umsetzung der ECL-Lösung durch die Meerrettich-Peroxidase wurde die Membran mit der Proteinseite nach oben auf ein Chromatographie-Papier gelegt und mit diesem luftblasen- und faltenfrei in Frischhaltefolie eingepackt, um sie vor Austrocknung zu schützen. Die eingepackte Membran wurde in der Dunkelkammer für einige Sekunden bis Minuten auf einen Röntgenfilm (Boehringer, Mannheim) aufgelegt und dieser anschließend entwickelt. Proteinbanden, an die der primäre Antikörper gebunden hatte, leuchteten aufgrund der enzymatischen Umsetzung der ECL-Lösung chemolumineszent und belichteten den Film an diesen Stellen. Die Proteingröße der auf dem Film sichtbaren Banden wurden



anhand des gefärbten Längenstandards, dessen Banden auf den Film übertragen wurden, abgeschätzt.

2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion nach reverser Transkription

Mit der Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) kann eine einzelne definierte RNA-Sequenz aus einem RNA-Pool herausgefischt, amplifiziert und mittels Gelelektrophorese weiteren Analysen zugänglich gemacht werden. Zur Identifikation einer bestimmten mRNA wird die gesamte mRNA des zu untersuchenden Gewebes in einer reversen Transkription in cDNA (copyDNA) umgeschrieben. Diese dient als Matrize für die PCR. Der cDNA-Doppelstrang wird durch Denaturierung getrennt, damit die Primer an ihre komplementären Bereiche binden und der DNA-Polymerase als Startpunkt für die Ergänzung des Einzelstranges zum Doppelstrang dienen können. Indem diese Schritte, Denaturierung, Bindung der Primer (Annealing) und Elongation zyklisch stattfinden, wird die gesuchte cDNA-Sequenz amplifiziert. Im optimalen Fall erhält man mit $x \cdot 2^n$ Kopien der gewünschten Sequenz, wobei x für die Anzahl der cDNA-Kopien zu Beginn der PCR und n die Zyklenzahl steht. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung von Einzelnukleotiden und PCR-Produkt oder -Produkten können die Fragmente durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht werden.

Die PCR wurde in dieser Arbeit mit verschiedenen Zielsetzungen verwendet. Einerseits diente sie der Untersuchung der zellspezifischen mRNA-Expression unterschiedlicher Proteine und Protein-Isoformen und der Beobachtung der mRNA-Expressionsregulierung im Fazialiskern nach peripherer Läsion. Andererseits wurden PCR-Produkte in Bakterien hineinkloniert, um spezifische Fragmente zur Synthese von Ribonukleotidsonden für *In-situ*-Hybridisierungen zu gewinnen und um sie Sequenzanalysen zugänglich zu machen. So wurden die ratten-spezifischen Sequenzen der Neuregulin-1 Typ-II und Typ-III N-Termini identifiziert. Die RNA-Isolation, die reverse Transkription und das Grundprotokoll aller RT-PCRs waren jeweils identisch. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Die jeweiligen optimalen PCR-Bedingungen sind in Tabelle 2.2 dargestellt.



2.5.1 RNA-Isolation

Im Laufe dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden der RNA-Isolation eingesetzt, von denen eine, die Phenol-Extraktion, die gesamte RNA aus den Geweben oder Zellen isoliert, während die andere nur die mRNA extrahiert, die an ihren Poly-Adenosin-Schwänzen erkannt wird. Zu dieser zweiten Methode wurde gewechselt, da sie effizienter und schneller in der Durchführung ist und weitgehend ohne gesundheitsschädliche Zusätze arbeitet. Um die Vergleichbarkeit beider Isolationen zu testen, wurde RNA aus Gehirn und Astrozytenkulturen mit beiden Methoden parallel gewonnen, in cDNA transkribiert und in RT-PCRs mit verschiedenen Primerpaaren eingesetzt. Die PCR-Ergebnisse waren qualitativ identisch, jedoch mit einer höheren cDNA-Ausbeute bei Anwendung der mRNA-Isolation.

2.5.1.1 Isolation von Total-RNA mittels Phenol-Extraktion

Um die Total-RNA aus kultivierten Zellen isolieren zu können, wurden sie durch Abschaben oder Trypsinisieren (0,25 % in PBS; Gibco Life Technologies, Rockville, USA) geerntet, abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Zellpellets oder Gewebestücke wurden in 400 µl Tri-Reagent (Sigma, Deisenhofen) mechanisch mit einem Kunststoffhomogenisator (Dystroy-S, Biozym, Mannheim) zerkleinert, weiter 600 µl Tri-Reagent zugesetzt und das Lysat für 5 Min. bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben kurz geschüttelt, 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 4 °C für 15 Min. bei 12.000 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren drei Phasen sichtbar, von denen die untere Proteine in Phenol-Chloroform-Lösung enthielt, die mittlere die DNA und die obere die RNA in wässriger Lösung. Die RNA-Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem 500 µl iso-Propanol vorgelegt worden waren. Nach gutem Mischen wurde die RNA für 15 Min. bei Raumtemperatur gefällt und erneut zentrifugiert (wie oben). Der Überstand wurde verworfen und das oft nicht sichtbare Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Aufnahme in 20 µl Tris-HCl (10 mM, pH 7,0) wurde es bei 56 °C gelöst und danach bei 260 nm und 280 nm photometrisch vermessen, um Konzentration und Reinheit zu überprüfen. Anschließend wurde die Probe zur



Entfernung von eventuell vorhandener genomischer DNA mit 0,5 µl RNase-freier DNase I (Boehringer, Mannheim) versetzt, 15 Min. bei 37 °C verdaut und mit 2 µl Natriumacetat (3 M) und 50 µl Äthanol (100 %) für 1 Std. bei -80 °C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet mit 400 µl Äthanol (70 %) gewaschen, wieder abzentrifugiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Aufgenommen wurde es wieder in 20 µl Tris-HCl (10 mM, pH 7,0) und bei 56 °C gelöst. 1 µl wurde 1:100 in Wasser verdünnt und die optische Dichte der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm erneut photometrisch bestimmt. Anhand dieses Wertes konnte die RNA-Konzentration berechnet werden:

$$1OD_{260} = 40 \mu\text{g} / \mu\text{l} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.5.1.2 Isolation von mRNA

Die Methode der mRNA-Isolation mit dem Dynabeads mRNA DIRECT-Kit (Dyna, Hamburg) nutzt die Hybridisierung von mRNA-Poly-Adenosin-Schwänzen an poly-Thymidin-Ketten, die an magnetischen Kügelchen immobilisiert sind. Die Kügelchen können nach dem Anheften der mRNA mit einem Magneten aus der Lösung abgetrennt werden.

Zellpellets oder Gewebestücke (max. 5 mg Gewebe oder $4 \cdot 10^4$ Zellen pro 20 µl Dynabeads) wurden mit 100 µl Lysispuffer versetzt und homogenisiert. Anschließend wurden 20 µl mRNA-direct-Dynabeads zugegeben und für 5 Min. auf einem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert, um die Hybridisierung der poly-Adenosin-Schwänze der mRNA mit den poly-Thymidin-Schwänzen an den Kügelchen zu erlauben. Die Reaktionsgefäße wurden dann in einen Magneten (MPC-E, Dynal, Hamburg) gestellt, wodurch sich die Kügelchen mit der angehefteten mRNA an der Rückwand der Gefäße ablagerten. Die mRNA-freie Lösung wurde abpipettiert, das Gefäß aus dem Magneten entfernt, und die mRNA-Kügelchen 2 mal mit Waschpuffer A und 1 mal mit Waschpuffer B gewaschen, wobei die Abnahme der Lösung immer wie oben beschrieben im Magneten erfolgte. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Magnetkügelchen mit der gebundenen mRNA in sterilem Tris-HCl (10 mM, pH 7,0) aufgenommen und für 5 Min. auf 55 °C erhitzt. Hierdurch wurden die Wasserstoff-Brückenbindungen



zwischen poly-Adenosin und poly-Thymidin getrennt und die mRNA ging in Lösung. Nach Einstellen der Reaktionsgefäße in einen erwärmten Magneten wurde die mRNA-Lösung abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aufgrund der niedrigen mRNA-Konzentration in Zellen (ca. 5 % der gesamten RNA) konnte der mRNA-Gehalt der Lösung nicht photometrisch bestimmt werden. Da jedoch die Kügelchen definierte Bindungskapazitäten aufweisen und definierte Ausgangsmengen für die standardisierte Prozedur eingesetzt wurden, konnte immer die gleiche mRNA-Menge von 2 µl für die reverse Transkription eingesetzt werden.

2.5.2 Reverse Transkription

Die RT-PCR kann entweder in einem Schritt oder in zwei getrennten Schritten durchgeführt werden. Wird nur ein Schritt gemacht, finden reverse Transkription und PCR in einem Reaktionsgefäß statt, in dem alle benötigten Enzyme und Zusatzstoffe mit der RNA zusammengegeben werden. Wird die RT-PCR in zwei Schritten durchgeführt, findet zunächst die reverse Transkription, meist in etwas größerem Maßstab, statt. Die dabei entstehende cDNA kann längere Zeit gelagert und in mehreren PCR-Ansätzen eingesetzt werden. Diese zweite Methode wurde generell in der hier vorliegenden Arbeit angewendet. Als Primer für die reverse Transkription wurde ein Gemisch zufälliger Hexamere verwendet, das eine gleichmäßige Transkription aller mRNA-Stücke ermöglichen soll, ohne eine bestimmte Region zu bevorzugen. Um spätere quantitative Aussagen machen zu können, wurde eine reverse Transkriptase eingesetzt, die jede einzelsträngige mRNA nur einmal in cDNA umschreibt.

Für die reverse Transkription wurde je 1 µg total RNA oder 2 µl mRNA und 2 µl Random-Primer (Promega, Mannheim) eingesetzt, das Gemisch mit H₂O auf 8,4 µl aufgefüllt und für 10 Min. bei 70 °C denaturiert. Anschließend wurde es, um die Denaturierung aufrecht zu erhalten, direkt auf Eis gelagert, bevor der Reaktionsgemisch aus je 4 µl 5 x Puffer, 4 µl dNTP (je 2 mM; MBI Fermentas, Wilna, Litauen), 15 U AMV-Polymerase (Amersham Pharmacia, Freiburg), 2 µl RNAsin (40 U/µl; Promega, Mannheim), 0,6 µl MgCl₂ (50 mM; MBI Fermentas, Wilna, Litauen) und 0,04 µl DTT (0,1 M) zugegeben wurde. Nachdem der Ansatz



gemischt und kurz abzentrifugiert wurde, fand die eigentlich reverse Transkription in einem PTC-225-Thermocycler (MJ-Research, Watertown, USA) statt. Nach dem Binden der Primer für 10 Min. bei 24 °C wurde für 50 Min. bei 42 °C, der optimalen Temperatur für die AMV-Polymerase, inkubiert, bevor die als Matrize dienende RNA nach Abschluß der Transkription bei einer 5minütigen Denaturierung bei 95 °C zerstört wurde. Anschließend wurde die Probe auf 4 °C gekühlt, bis sie 1:10 mit H₂O verdünnt und bei -80 °C eingefroren wurde. Die cDNA war so mehrere Monate stabil und für PCR einsetzbar.

2.5.3 Konstruktion spezifischer Primer

Für jede zu untersuchende mRNA werden zwei Oligonukleotide konstruiert, von denen jedes an einen Strang der doppelsträngigen cDNA-Matrize bindet. Man spricht hier von Sense- (3'-) und Antisense- (5'-) Primern, passend zu Antisense- und Sense-Strang der cDNA. Bei der Konstruktion eines Primerpaars ist zu beachten, daß beide die gleiche mittlere Schmelztemperatur (T_m), eine G:C-Klammer am 5'-Ende zur Erhöhung der Hybridisierungsstabilität und nach Möglichkeit ein instabiles 3'-Ende haben, um die Gefahr der Fehlbindung an andere als die Zielsequenzen zu verringern.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die mittlere Schmelztemperatur (T_m) von Primer-cDNA-Hybriden zu berechnen, die jedoch immer von der Nukleotidzusammensetzung und Länge des jeweiligen Primers abhängt. In der hier verwendeten Methode wird für die Nukleotide Adenosin und Thymin eine Schmelztemperatur von 2 °C angenommen, für Guanin und Cytidin 4 °C, vorausgesetzt, der GC-Gehalt liegt zwischen 50 und 60 %. T_m wird nach der Formel

$$T_m = 2 * (A + T) + 4 * (G + C).$$

berechnet.

Die Sequenzen der Primer wurden so ausgewählt, daß möglichst 2 G:C-Klammern, also GG, GC, CG oder CC, mit einem nachfolgendem A das 5'-Ende bildete, während die letzten 5 Nukleotide am 3'-Ende maximal 2 G oder C enthalten sollten. Diese zweite Bedingung war jedoch oft nicht einhaltbar. Außerdem wurden hohe Übereinstimmung mit der mRNA-Sequenz anderer Gene nach Möglichkeit durch Datenbank-Abgleiche ausgeschlossen. Die ausgewählten



Sequenzen wurden über eine FASTA- oder BLAST-Suche mit den Sequenzen der GenEmbl-Genbank verglichen. Es wurden nur solche Primer verwendet, die insgesamt höchstens 80 % Übereinstimmung mit einer fremden Sequenz aufwiesen. Wichtig war hierbei, daß der Primer am 3'-Ende keine Übereinstimmung mit einer Fremdsequenz zeigte.

Name	Sequenz	Quelle/Access-Nr.	Verwendung
Typ-I sen	gagcgcaaagaaggcagaggcaa	M92430	PCR, ISH
Typ-II ₁ sen	ggtggtgatcgaggga	(Shah et al., 1994)	ISH, Klon.
Typ-II ₂ sen	cgagcccagcaccgatcagcc	eigener Klon	PCR
Typ-III ₁ sen	cctggcttgctggtcagcctctgcct	L41827	Klon.
Typ-III ₂ sen	gcattgctggcctgaagtggga	eigener Klon	PCR, ISH
Nrg-pan ₁ -sen	ccacatcaacatccagactggg	M92430	PCR
Nrg-pan ₂ -sen	ccacgactgggaccagccatctc	M92430	PCR
Typ-I ₁ as	gcagctgactcctggctctcat	M92430	PCR
Typ-I ₂ as	ggagtactcggagctggttcgc	M92430	ISH
Typ-II ₁ as	gaacctgctgtcctccttgagcc	eigener Klon	PCR
Typ-II ₂ as	atgtacctgctgtcctcctga	(Shah et al., 1994)	ISH, Klon.
Typ-III as	ccacagcagcatggtcaccttgt	eigener Klon	PCR
α as	catcttgctccagtgaatccaggt	M92430	PCR
β as	gaagctggccattacgtagtttgg	U02322	PCR, ISH, Klon
α1 as	ccaagatgcttttctgggttga	M92430/M94166	PCR
α2 as	ctggtagagttcctccgctttt	M92430	PCR
α5 as	catcttgctccagtgaatccaggt	M92430/A294323	PCR
β1 as	ccaagatgctttagaagctggcc	U02322/M94166	PCR
β2 as	ctggtagagttcctccgctttg	U02322/M92430	PCR
β3 as	ggagtggacgtactgtagaagctg	U02322/ M94168	PCR
β4 as	cctcctagaagtcagttagaagctg	U02322	PCR
β5 as	catttgggcactgtagaagctggc	U02322/A294323	PCR
erbB-2 sen	cctgatcttagtggtgctgttg	X03362	PCR
erbB-2 as	ggatccgcatctgagcctggtg	X03362	PCR
erbB-3 sen	ggatggcccttgagagtaccac	U29339	PCR
erbB-3 as	gcagatctgggctgtgctaacc	U29339	PCR
erbB-4 sen	gcactggtcgatgctggggacc	AF041838	PCR
erbB-4 as	gcagtcagtgtctttggctctga	AF041838	PCR
cyclo sen	caactctaattctttgactgacggg	(Hol et al., 1999)	PCR
cyclo as	agagattacaggtattgcgag	(Hol et al., 1999)	PCR
zSP6	ggctatttagtgacactataggcc	Schwaiger, unpubliziert	PCR
	ccagtgtgctggaattctg		
zT7	gggtaatacagactcactataggga	Schwaiger, unpubliziert	PCR
	gcggccgccagtgatgg		

Tab. 2.1 Darstellung aller in dieser Arbeit verwendeten RT-PCR-Primer. Soweit die Primer nicht anderen Publikationen entnommen oder anhand eigener Sequenzen konstruiert wurden, wurde die jeweilige Datenbank-Access-Nummer (genEMBL) als Quelle angegeben. Verwendet wurden die Primer für RT-PCR „PCR“, zur Synthese von Ribonukleotidsonden („ISH“) und zur Gewinnung rattenspezifischer Neuregulin-1 Sequenzen („Klon“).



2.5.4 RT-PCR-Grundprotokoll

Die PCR-Reaktion wurde in 12,5 µl Ansätzen in einem Thermocycler mit Heizdeckel ausgeführt. Die verwendete Taq-DNA-Polymerase wurde vor der Verwendung mit 1 µl TaqStart-Antikörper pro 20 U Polymerase versetzt, der bei Raumtemperatur an das aktive Zentrum der Polymerase bindet. Erst bei einer Temperatur von über 80 °C wird der Antikörper zerstört und die Polymerase freigegeben, wodurch die Amplifikation unspezifischer Primer-cDNA-Doppelstränge während der ersten Aufheizphase verhindert wird. Die klassische Methode, eine solche unspezifische Amplifikation zu verhindern, stellt der "Hotstart" dar, das Zugabe der Polymerase zu jedem einzelnen Ansatz, wenn dieser bereits im Thermocycler eine Temperatur von über 80 °C erreicht hat. Die Vermeidung des "Hotstarts" ließ die semiquantitativen Bestimmungen exakter werden und stellte außerdem eine Effizienzsteigerung durch Zeitersparnis dar. Zu 250 µl RedTaq DNA-Polymerase (1U/µl; Sigma, Deisenhofen) wurden 12,5 µl TaqStart Antikörper (Clontech, Palo Alto, USA) und 65,6 µl Taq-Verdünnungspuffer gegeben und für 10 - 30 Min. die Bindung des Antikörpers bei Raumtemperatur ermöglicht. Die antikörper-geschützte Polymerase konnte bei -20 °C mehrere Wochen lang aufgehoben werden.

Für jedes verwendete Primerpaar mußten die optimalen Bedingungen ausgetestet werden. Diese wurden durch Variationen der $MgCl_2$ -Konzentration, der Primer-Bindungstemperatur (Annealingtemperatur) und der Zyklenzahlen ermittelt. Zunächst wurde eine $MgCl_2$ -Konzentrationsreihe bei einer Bindungstemperatur, die 7 - 9 °C unter T_m lag, mit 38 Zyklen durchgeführt. Waren bei allen $MgCl_2$ -Konzentrationen außer der Hauptbande noch Nebenbanden zu sehen, wurde die Konzentrationsreihe mit einer höheren Bindungstemperatur wiederholt, bis eine deutliche Bande ohne Nebenbanden nach der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte vorlag. Je nach Bandenintensität konnte auch die Zyklenzahl nach oben oder unten geändert werden. Die verwendeten PCR-Bedingungen für alle Primer sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.



erkannte DNA-Sequenz	Anwendung		
	Nachweis-PCR/ ISH	semiquantitative Analyse	
		1. PCR	2. PCR
Typ-I: Is + I ₁ as	1 mM; 65 °C; 38 Z.	1 mM; 65 °C; 36 Z.	
Typ-I: Is + I ₂ as	2 mM; 65 °C; 40 Z.		
Typ-II: II ₂ s + II ₁ as	1 mM; 65 °C; 38 Z.	1mM; 65 °C; 32 Z.	
Typ-II: II ₁ s + II ₂ as	1 mM; 65 °C; 40 Z.		
Typ-III: III ₂ s + IIIas	1 mM; 65 °C; 36 Z.	1mM; 65 °C; 30 Z.	
Typ-III: III ₁ s + βas	1 mM; 65 °C; 40 Z.		
α: pan ₁ -s + α-as	1 mM; 65 °C; 38 Z.		
β: pan ₁ -s + β-as	1 mM; 65 °C; 38 Z.		
α1: pan ₁ -s + α1-as	1 mM; 65 °C; 40 Z.		
α2: pan ₁ -s + α2-as	1 mM; 65 °C; 40 Z.		
α5: pan ₁ -s + α1-as	1 mM; 65 °C; 40 Z.		
β1: pan ₁ -s + β1-as	1 mM; 65 °C; 38 Z.	1 mM; 65 °C; 34 Z.	
β2: pan ₁ -s + β2-as	1 mM; 65 °C; 40 Z.	1 mM; 65 °C; 12 Z.	
β2: pan ₂ -s + β2-as			1 mM; 65 °C; 32 Z.
β3: pan ₁ -s + β3-as	1 mM; 67 °C; 40 Z.	1 mM; 67 °C; 12 Z.	
β3: pan ₂ -s + β3-as			1 mM; 67 °C; 30 Z.
β4: pan ₁ -s + β4-as	1 mM; 65 °C; 40 Z.	1 mM; 65 °C; 12 Z.	
β4: pan ₂ -s + β4-as			3 mM; 67 °C; 34 Z.
β5: pan ₁ -s + β5-as	1 mM; 65 °C; 40 Z.	1 mM; 65 °C; 12 Z.	
β5: pan ₂ -s + β5-as			1 mM; 65 °C; 30 Z.
Typ-I-α2:Is + α2-as	2 mM; 65 °C; 40 Z.		
Typ-I-β1:Is + β1-as	2 mM; 65 °C; 40 Z.		
Typ-I-β3:Is + β3-as	2 mM; 65 °C; 40 Z.		
Typ-I-β4:Is + β4-as	2 mM; 65 °C; 40 Z.		
Typ-II-β1:II ₂ s + β1-as	2 mM; 65 °C; 44 Z.		
Typ-II-β2:II ₂ s + β2-as	2 mM; 65 °C; 44 Z.		
Typ-III-α2: III ₂ s + α2-as	2 mM; 65 °C; 40 Z.		
Typ-III-β1: III ₂ s + β1-as	3 mM; 65 °C; 38 Z.		
Typ-III-β2: III ₂ s + β2-as	3 mM; 65 °C; 38 Z.		
Typ-III-β3: III ₂ s + β3-as	3 mM; 65 °C; 38 Z.		
Typ-III-β4: III ₂ s + β4-as	2 mM; 65 °C; 38 Z.		
Typ-III-β5: III ₂ s + β5-as	2 mM; 65 °C; 38 Z.		
erbB-2	2 mM; 65 °C; 38 Z.		
erbB-3	2 mM; 65 °C; 38 Z.	2 mM; 65 °C; 32 Z.	
erbB-4	1 mM; 65 °C; 38 Z.	1 mM; 65 °C; 32 Z.	
cyclophilin A		1 mM; 59 °C; 28 Z.	
zSP6/zT7	3 mM; 64 °C; 34 Z.		

Tab. 2.2 Auflistung der für die verschiedenen Primerpaare und Anwendungen verwendeten PCR-Bedingungen: MgCl₂-Konzentration, optimale Annealingtemperatur der Primer und Zyklenzahl. Bei zweistufigen, semiquantitativen RT-PCRs sind die beiden eingesetzten Primerpaare untereinander angegeben, die Bedingungen der beiden nacheinander auszuführenden PCR's versetzt nebeneinander.



Für die PCR-Reaktionen wurden in einem Reaktionsgemisch beide Primer, Deoxynukleotide, Magnesiumdichlorid, antikörper-geschützte Taq-Polymerase und Polymerase-Puffer in Wasser zusammengegeben. Je 11,5 µl dieses Mixes wurden auf PCR-Reaktionsgefäße verteilt, 1 µl cDNA einzeln zugegeben, kurz anzentrifugiert und die PCR anschließend in einem PTC-225-Thermocycler (MJ Research, Watertown, USA) durchgeführt.

Ansatz pro Probe:

- 1,25 µl Taq-Polymerase-Puffer (10x; Sigma, Deisenhofen)
- 1,25 µl dNTPs (je Nukleotid 2mM; MBI Fermentas, Wilna, Litauen)
- 1,25 µl Antisense-Primer (10 mM; Interactiva, Ulm)
- 1,25 µl Sense-Primer (10 mM; Interactiva, Ulm)
- 1,25 µl antikörper-geschützte TaqPolymerase (1 U Enzym; Antikörper: TaqStart, Clontech, Palo Alto, USA; Polymerase: RedTaq-DNA Polymerase, Sigma, Deisenhofen)
- 0 - 0,75 µl MgCl₂ (50 mM; MBI Fermentas, Wilna, Litauen)
- mit dd H₂O auf 11,5 µl auffüllen
- 1 µl cDNA

Standardprogramm:

1. 95 °C; 2 Min.; einleitende Denaturierung
2. 95 °C ; 30 Sek. + 1 Sek. pro Zyklus; Denaturierung
3. Annealingtemperatur; 10 Sek.; Primerbindung
4. 72 °C; 40 Sek.; Elongation doppelsträngiger Fragmente
5. Wiederholung von 2. - 4., Anzahl der Wiederholungen variabel
6. 72 °C; 5 Min.; abschließende Elongation
7. 4 °C; endlos

2.5.5 Semiquantitative RT-PCR

Um die Expressionsregulation von Proteinen auf transkriptionaler Ebene zu untersuchen, wurde semiquantitative RT-PCR eingesetzt. Dabei wurden jeweils der kontralaterale und ipsilaterale Fazialiskern nach peripherer Läsion des Nervs



bezüglich der enthaltenen Menge der zu untersuchenden mRNA-Spezies verglichen. Außer der $MgCl_2$ -Konzentration und Bindungstemperatur der Primer mußte hierbei auch die Zyklenzahl der RT-PCR optimiert werden. Ein semi-quantitativer Vergleich kann nur im Bereich exponentieller Amplifikation durchgeführt werden. Ungefähr zwischen dem 25. und 35. Zyklus geht dieser aufgrund von Primer- und cDNA-Verbrauch und Enzymermüdung in den Sättigungsbereich über. Um den Übergang aus der exponentiellen in die Sättigungsphase festzustellen, wurde eine Zyklusreihe gemacht. Mit den ermittelten optimalen Bedingungen bezüglich $MgCl_2$ -Konzentration, Annealingtemperatur und Zyklenzahl wurden von je 6 Proben pro Zeitpunkt RT-PCRs mit je 6 identischen Ansätzen für axotomierte und Kontrollseite gemäß dem Grundprotokoll durchgeführt.

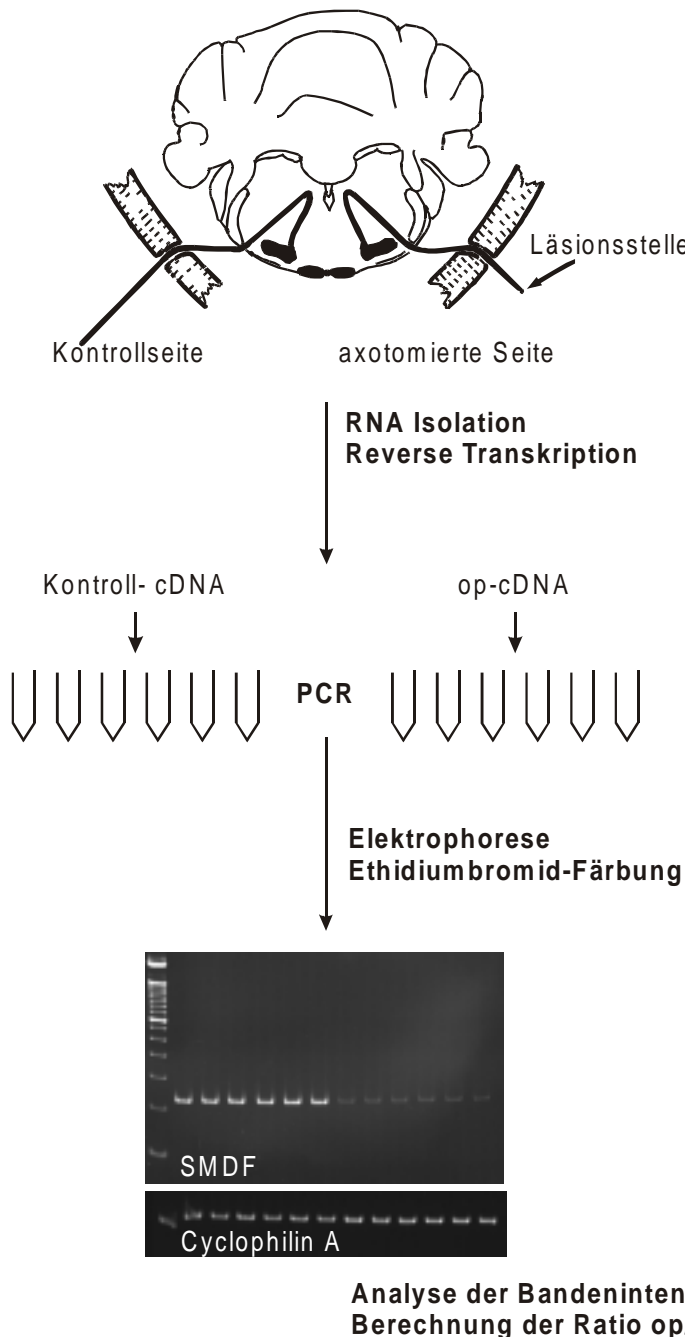


Abb. 2.2 Schematische Darstellung des Ablaufs einer semiquantitativen RT-PCR zur Analyse von Expressionsänderungen im Fazialiskern nach peripherer Läsion des Nervs.



Bei den semiquantitativen Untersuchungen war zu beachten, daß zusammengehörende Proben jeweils mit dem gleichen Reaktionsgemisch angesetzt und zusammen im gleichen Block des Thermocyclers amplifiziert wurden. Zu vergleichende PCR-Produkte, also axotomierte und zugehörige Kontrollseite, wurden jeweils auf das gleiche Gel aufgetragen, um identische Behandlungen zu gewährleisten (Abb. 2.2).

2.5.5.1 Semiquantitative zweistufige RT-PCR

Weist ein Gen eine sehr niedrige Transkriptionsrate auf, ist es nicht möglich, eine semiquantitative RT-PCR nach dem obigen Schema durchzuführen, da die Detektionsgrenze in den Sättigungsbereich der PCR fällt. Niedrig exprimierte mRNAs wurden in einer zweistufigen semiquantitativen RT-PCR untersucht (Hager et al., 1999), wenn möglich unter Verwendung von zwei geschachtelten Primerpaaren („nested PCR“). Bei geschachtelten Primerpaaren amplifiziert das zuerst angewandte Paar ein größeres Fragment, das die Bindungsstellen des zweiten Primerpaares umfaßt. In der RT-PCR mit dem zweiten, inneren Primerpaar wird das Produkt der ersten RT-PCR als cDNA eingesetzt. Bei der Untersuchung der Neuregulin-1 Spleißvarianten war es teilweise nicht möglich, zwei Primerpaare zu konstruieren, da die isoform-spezifischen Bereiche zu kurz waren, um zwei Primer in ihnen zu lokalisieren, weshalb der isoformspezifische Primer in beiden aufeinanderfolgenden PCRs beibehalten und nur der zweite ausgetauscht wurde („seminested PCR“) (Abb. 2.3).

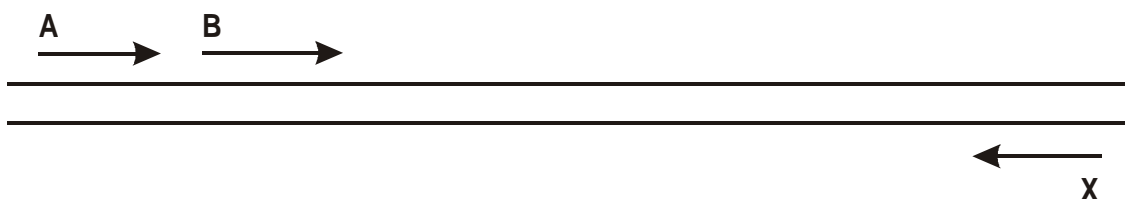


Abb. 2.3 Schematische Darstellung der Lokalisierung der in einer seminested, semiquantitativen RT-PCR verwendeten Primer. In der ersten Amplifikation wird der Sense-Primer A mit dem Antisense-Primer X kombiniert, in der zweiten Amplifikation der Sense-Primer B mit dem Antisense-Primer X.

Um eine solche zweistufige PCR auszuführen, wurde eine erste semiquantitative RT-PCR durchgeführt, jedoch mit nur 12 Zyklen. Die Produkte identischer Ansätze



wurden nach der Amplifikation zusammengegeben, mit dem QuiaQuick PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden) aufgereinigt und mit 30 µl Tris-HCl (10 mM, pH 7,0) aus der Säule eluiert. Von diesem Eluat wurden 2 µl pro Ansatz in einer zweiten semiquantitativen PCR als cDNA eingesetzt. Diese zweite PCR wurde mit dem gleichen Antisense-Primer wie die vorherige, aber mit einem anderen Sense-Primer durchgeführt.

2.5.6 Polyacrylamidgel-Elektrophorese von PCR-Produkt

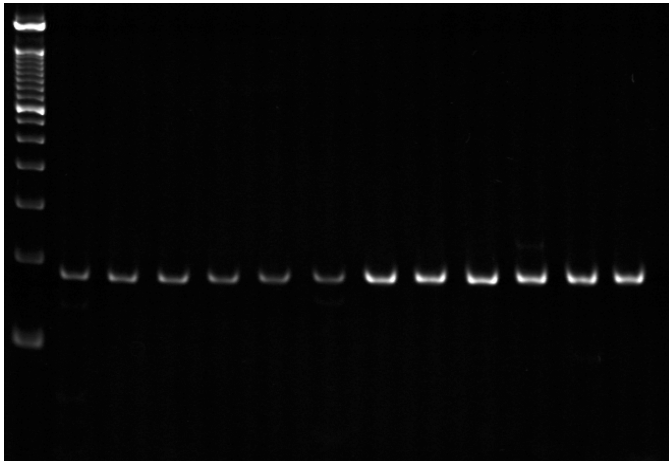
Die PCR-Proben, die aufgrund der Verwendung von RedTaq-DNA-Polymerase (Sigma, Deisenhofen) bereits Ladepuffer enthielten, wurden nach der Amplifikation kurz abzentrifugiert und 5 µl pro Tasche auf ein 8 %iges Polyacrylamidgel (Minigel-System, Höfer Pharmacia, San Francisco, USA) aufgetragen. Zu vergleichende Proben des gleichen Tierpools (op- und ko-Seite) wurden nebeneinander auf das gleiche Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 150 V mit TBE als Laufpuffer durchgeführt, bei Laufzeiten zwischen 45 Min. und 90 Min., je nach Länge des zu erwartenden Fragments. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 30 Min. in Ethidiumbromid (5 µg/ml in TBE) gefärbt, 30 Min. in Wasser gewaschen und anschließend mit einer CCD Kamera aufgenommen unter Verwendung der Bioprint-Software (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallee, Frankreich).

2.5.7 Auswertung semiquantitativer RT-PCR

Um RT-PCR-Proben semiquantitativ auswerten zu können, wurden die Banden unter definierten Bedingungen (Integrationszeit: 280 mSek. Gain:116.; Offset:130) aufgenommen. Durch die Blende wurde die Helligkeit der Banden knapp unter der Sättigung eingestellt. Im Image Master-Auswertungsprogramm (Pharmacia, Freiburg) wurden die Banden markiert und ihre integrierte optische Dichte (IOD) bestimmt. Die IOD-Werte wurden in das Kalkulationsprogramm Microsoft-Excel übertragen und der Mittelwert der je sechs identischen Ansätze (Kontrollseite und operierte Seite) errechnet. Aus diesen beiden Mittelwerten wurde das Verhältnis (op/co) gebildet, um ein Maß der Regulation zu erhalten. Da jedoch die Gesamt-cDNA-Konzentrationen der beiden Seiten selten absolut identisch sind, wurde der Regulationswert (op/co) gegen einen Standard nomalisiert. Als Standard diente das op/co-Verhältnis einer semiquantitativen RT-PCR mit Primern gegen das



Housekeeping-Gen Cyclophilin-A, dessen Expression im Fazialiskern sich nach der Läsion nicht verändert (Abb. 2.4). Dieser Cyclophilin-A-Wert wurde für jeden der verwendeten Proben ermittelt.



Kontrolle						
Lanes:	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 5	Lane 6
Bands	(IOD)	(IOD)	(IOD)	(IOD)	(IOD)	(IOD)
1	11678	15673	16944	13889	12942	11361
Sum	1,17E+04	1,57E+04	1,69E+04	1,39E+04	12942	11361
In Lane	3,47E+04	2,91E+04	3,93E+04	3,95E+04	4,23E+04	3,87E+04
Mittel						13747,833
StDev						2216,855
StDev %						16,125

Axotomie						
Lanes:	Lane 7	Lane 8	Lane 9	Lane 10	Lane 11	Lane 12
Bands	(IOD)	(IOD)	(IOD)	(IOD)	(IOD)	(IOD)
1	40853	41799	44947	42545	41569	4,04E+04
Sum	40853	41799	44947	4,25E+04	4,16E+04	4,04E+04
In Lane	5,91E+04	6,04E+04	6,21E+04	5,76E+04	5,60E+04	5,66E+04
Mittel						42017,667
StDev						1618,900
StDev %						3,853
						op/co
						cyclo
						Reg.
						3,056
						0,920
						3,322

Abb. 2.4 Beispiel-Auswertung einer semiquantitativen RT-PCR. Das Elektrophorese-Gel wurde unter definierten Bedingungen aufgenommen, die integrierten optischen Dichten (IOD) der Banden bestimmt und die Mittelwerte der zusammengehörenden IOD's berechnet (Mittel). Die Mittelwert der Kontrollseite (co) wurde durch den der axotomierten (op) geteilt (ko/op). Dieses Verhältnis wurde anschließend gegen das co/op-Verhältnis der Cyclophilin-A-Bestimmung des selben Tieres (cyclo) normalisiert. Der so erhaltene Wert stellt den Regulationswert (Reg.) dieser Bestimmung dar.



Für negative Regulationen, also Abnahmen der spezifischen mRNA-Konzentration nach Axotomie, wurde das Verhältnis der Kontroll- zur axotomierten Seite (co/op) berechnet und durch den entsprechenden Cyclophilin-A-Wert geteilt. Alle Proben eines Zeitpunkts wurden nach diesem Verfahren ausgewertet, die Werte wurden gemittelt (Regulationswert x), die Standardabweichungen berechnet und für die graphische Darstellung in Prozentwerte umgerechnet, nach der Formel:

$$(x - 1) * 100 = \% \text{ Regulation}$$

Die Signifikanz der ermittelten Expressionsregulierungen wurde durch den Vergleich der sechs Werte jedes Zeitpunkts mit den sechs Kontrollwerten mittels Students-t-Test bestimmt.

2.6 *In-situ*-Hybridisierung

Um die zelluläre Verteilung einer mRNA im Gewebe zu analysieren, kann sie auf Gewebeschnitten mit einer radioaktiv markierten Ribonukleotidsonde hybridisiert und durch Autoradiographie visualisiert werden. Als Sonde kann ein PCR-Fragment dienen, das durch *in vitro* Transkription in eine RNA-Sequenz überscriben wurde. Um das Fragment mit spezifischen flankierenden Sequenzen zu versehen, die für die Bindung der Polymerase in der *in vitro* Transkription notwendig sind, muß das Fragment vorher in ein Plasmid eingeschleust und in Bakterien vermehrt worden sein.

2.6.1 Klonierung von PCR-Fragmenten in *E. coli*

Eine RT-PCR mit sechs identischen Ansätzen wurde mit Primern, spezifisch für die in der *In-situ*-Hybridisierung zu detektierende mRNA, durchgeführt. Die Ansätze wurden anschließend zusammengegeben und mit dem QuiaQuick PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden) aufgereinigt. Anstelle des Eluierungs-Puffers wurde Wasser für die Elution des PCR-Produktes am Ende der Aufreinigung verwendet, da die im Puffer enthaltenen Salze die folgenden enzymatischen Schritte beeinflussen könnten. Auf einem 1,5 %igen Agarosegel wurden 3 µl des Eluats aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und in ihrer Konzentration



abgeschätzt. Je nach Bandenintensität wurden zwischen 3 µl und 7 µl des aufgereinigten Fragments für die nachfolgende Klonierung eingesetzt. Als erstes mußten die nach der PCR vorliegenden cDNA-Doppelstränge mit glatten Enden versehen werden. Hierzu wurde das PCR-Produkt mit 2,5 U PFU-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA), 1 µl dNTP (2 mM pro Nukleotid; MBI Fermentas, Wilna, Litauen) und 1 µl 10 x Polymerase-Puffer (Stratagene, La Jolla, USA) zusammengegeben, auf 10 µl mit Wasser aufgefüllt und für 30 Min. bei 72 °C inkubiert. Anschließend fand die Einschleusung des Fragments in das Plasmid statt. Hierzu wurden zu 0,5 µl pZero-Vektor (Invitrogen, Groningen, Niederlande) 2 µl PCR-Fragment mit glatten Enden, 0,5 µl rATP (10 mM, Stratagene, La Jolla, USA), 1 µl Ligase-Puffer, 1 µl T4-Ligase (Eurogentec, Seraing, Belgien) und 5 µl Wasser gut gemischt und für mindestens 1 Std. bei Raumtemperatur ligiert.

Nun wurde das Plasmid mit dem von SP6- und T7-Bindungsstellen flankierten Insert mittels Elektroporation in die Bakterien eingeschleust. Dazu wurden kompetente *E. coli* Kulturen langsam auf Eis aufgetaut, 45 µl zu 2 µl ligiertem Plasmid gegeben und die Suspension in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation der Bakterien erfolgte in einem Gene-Pulser (Biorad, München) bei einer Spannung von 2,5 V, einer Kapazität von 25 F und einem Widerstand von 200 Ω. Unmittelbar danach wurde 1 ml SOC-Medium zu den Bakterien gegeben, die Suspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 1 Std. bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, um den Bakterien Zeit für die Aufnahme des Plasmids zu geben. Von der transfizierten Bakterienprobe wurden 200 µl auf LLB-Agar-Platten, versetzt mit IPTG (0,5 mM), Zeozin (5 µg/ml) und Tetrazyklin (1,25 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Klone sollten den Vektor mit dem spezifischen Insert enthalten, da auf diesem die Antibiotika-Resistenzen lokalisiert waren. Nicht transformierte Bakterien enthielten diese Resistenzen nicht und sollten somit auf den verwendeten Platten nicht wachsen können. Um jedoch die Transfektion positiv zu überprüfen, wurden eine PCR mit Primern gegen die flankierenden SP6- und T7-Bindungsstellen durchgeführt. Hierbei wurde mit einer Pipettenspitze Zellmaterial direkt von der Agar-Platte in die PCR-Röhrchen mit dem Supermix gegeben. Die PCR wurde mit 3 mM MgCl₂, 64 °C Bindungstemperatur und 34 Zyklen durchgeführt. Nach



Auftrennung der Produkte auf einem 1,5 %igen Agarosegel konnte anhand der Produktgröße festgestellt werden, ob das PCR-Fragment in das Plasmid inseriert worden war.

2.6.2 Plasmidpräparation

In der PCR-Untersuchung positive Klone wurden in Flüssigkulturen hochgezogen, um dann für weitere Analysen und Verwendungen zur Verfügung zu stehen. Hierzu wurden mit einer Pipettenspitze Bakterien der positiven Klone in 50-ml Zentrifugenröhrchen mit 20 ml LLB-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (300 rpm) kultiviert. Von den Kulturen wurden 400 µl abgenommen, mit 100 µl Glycerol versetzt und auf -80 °C zur Lagerung eingefroren. Die restlichen Kulturen wurden für 10 Min. bei 4 °C und 3000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1,8 ml STET aufgenommen. Nach Homogenisierung wurden die Bakterien in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 40 µl Lysozym (Boehringer, Mannheim) bei Raumtemperatur für 10 Min. angedaut, für 2 Min. gekocht und anschließend sofort auf Eis gelagert, bevor die Zellbruchstücke für 20 Min. bei 12000 rpm und 4 °C abzentrifugiert wurden. Da der in ein neues Reaktionsgefäß überführte Überstand außer der Vektor-DNA auch RNA enthielt, mußte er einem RNase-Verdau unterworfen werden. Hierzu wurde RNase A (Boehringer, Mannheim) zunächst zur Deaktivierung der enthaltenen DNase für 15 Min. auf 70 °C erhitzt, bevor 10 µl der nun DNase-freien RNase-A zum Überstand gegeben und dieser für 15 Min. bei 37 °C inkubiert wurde. Im Anschluß wurden 80 µl des Ionenaustauschers CTAB zugegeben und die Probe für mindestens 5 Min. bei Raumtemperatur belassen. Nach einer 5minütigen Zentrifugation bei 12.000 rpm wurde das Pellet in 400 µl 1,2 M NaCl aufgenommen, 5 Min. auf Eis gestellt, 10 Min. bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 1 ml Äthanol (100 %) wurde das Plasmid für 10 Min. auf Eis gefällt, erneut wie oben zentrifugiert, das Pellet mit 1 ml Äthanol (70 %) gewaschen, abzentrifugiert, bei Raumtemperatur getrocknet, in 50 µl Tris-HCl (10 mM, pH 7,0) aufgenommen und bei 50 °C gelöst. Von einer 1:100 Verdünnung



der Lösung wurde die optische Dichte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und daraus die DNA-Konzentration bestimmt. Hierbei gilt:

$$1OD_{260} = 50 \mu\text{g/ml} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Eine 1:500 Verdünnung des isolierten Plasmids wurde in einer PCR mit sechs identischen Ansätzen unter Einsatz von SP6- und T7-Primer eingesetzt, die Ansätze wurden vereinigt und über eine QIAquick-Säule (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Dieses aufgereinigte Fragment konnte nun als Matrize für die Herstellung einer Ribonukleotidsonden oder zur Sequenzierung verwendet werden. Jedes Plasmide wurde in den institutseigenen Einrichtungen des MPI für Neurobiologie sequenziert.

Die Klonierung von PCR-Produkten und ihre anschließende Sequenzierung wurde nicht nur genutzt, um Fragmente für Ribonukleotidsonden herzustellen und zu kontrollieren, sondern auch um zwei rattenspezifische Sequenzen zu erhalten, die nicht in der GenEMBL-Datenbank eingetragen waren. Hierbei handelte es sich um Typ-II und Typ-III spezifisch Sequenzen im N-terminalen Bereich von Neuregulin-1. Die RT-PCR, deren Produkte kloniert und sequenziert wurden, wurde mit Primern durchgeführt, die der humanen Sequenz entsprechen, unter Verwendung von Ratten-cDNA.

2.6.3 Synthese der Ribonukleotidsonden

Zur Synthese der Ribonukleotidsonde wurden ca. 200 ng Produkte der Plasmid-PCR mit 2 µl 10 x Transkriptionspuffer (Boehringer, Mannheim), 5 µl H₂O, 2 µl SP6- oder T7-Polymerase (Boehringer, Mannheim), 1 µl dNTP (MBI Fermentas, Wilna, Littauen), 0,5 µl RNAsin (Promega, Mannheim) und 4 µl α³⁵S-UTP (Amersham, Freiburg) für 40 Min. bei 37 °C inkubiert, kurz abzentrifugiert und nach erneuter Zugabe von 1 µl Polymerase wieder für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Die Transkription wurde durch die Deaktivierung der Polymerase bei 65 °C abgestoppt und die DNA-Matrize durch Verdau mit 1 µl RNase-freier DNase-I (Boehringer, Mannheim) für 15 Min. bei 37 °C zerstört. Anschließend wurde die Sonde mit 20 µl Ammoniumacetat (5 M) und 100 µl kaltem Äthanol (100 %) bei -80 °C gefällt, 15 Min. bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugiert, das Pellet mit 400 µl



Äthanol (70 %) gewaschen, erneut zentrifugiert und getrocknet. Aufgenommen wurde es in 20 µl Wasser und der radioaktive Einbau in einem LS-6500-Szintillationszähler (Beckmann, Fullerton, USA) gemessen.

2.6.4 *In-Situ*-Hybridisierung

Gefrierschnitte von 4 % PFA fixierten Gehirnen wurden aufgetaut, getrocknet, für 10 Min. in 4 % Formalin in 1 x PBS nachfixiert, in PBS gewaschen und mit 1 µg/ml Proteinase-K (Boehringer, Mannheim) in Proteinase-Puffer bei 37 °C für 10 Min. angedaut. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte für 10 Min. in 0,1 M Triethanolaminhydrochlorid (pH 8,0) mit 0,25 % Essigsäureanhydrid acetyliert. Danach wurden die Schnitte wieder in PBS gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Chloroform permeabilisiert und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden pro Objektträger 100 µl Hybridisierungsmix mit $2 \cdot 10^6$ cpm Ribonukleotidsonde aufgetragen, die Schnitte mit einem sterilen Deckglas abgedeckt und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 50 °C (Sonde: Nrg-1 Typ-I), bzw. 55 °C (Sonden: Nrg-1 Typ-II und -III) hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte mit steigender Stringenz gewaschen, zunächst für 5 Min. in 5 x SSC mit 0,1 M DTT bei einer Temperatur 5 °C unter der jeweiligen Hybridisierungstemperatur, dann in 2 x SSC, 50 % Formamid und 0,1 M DTT bei Hybridisierungstemperatur (Sonde: Nrg-1 Typ-I), bzw. 5 °C wärmer als diese (Sonden: Nrg-1 Typ-II und -III). Nicht hybridisierte Sonde wurde außerdem durch einen RNase-A-Verdau (Boehringer, Mannheim) bei 37 °C in RNase-Puffer entfernt. Die Schnitte wurden danach bei Raumtemperatur in 0,1 x SSC gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und an der Luft getrocknet.

2.6.5 Detektion der radioaktiven Sonde nach *In-Situ*-Hybridisierung

Um die zelluläre Verteilung der radioaktiven Markierung im Gewebe zu detektieren, wurden die Objektträger mit Filmemulsion (NTB2 1:2 mit Wasser verdünnt; Eastman Kodak Company, New Haven) beschichtet und drei Tage (Nrg-1 Typ-I und -II), bzw. fünf Tage lang (Nrg-1 Typ-III) bei 4 °C lichtgeschützt und trocken exponiert. Nach diesem Zeitraum wurde die Emulsion in D-19 Photoentwickler (1:1 mit Wasser verdünnt; Eastman Kodak Company, New Haven) für 4 Min. entwickelt, 1 Min. gewässert und 5 Min. fixiert (Kodak F24). Nach erneutem



Wässern wurden die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt, gebläut, entwässert und mit DePex-Einschlußmittel (BDH, Poole, England) eingedeckt. Aufnahmen der Autoradiographien wurden mit einem Axiophot (Zeiss, Jena) gemacht, Dunkelfeldaufnahmen mit Hilfe einer Fiber-Lite PL800 Dunkelfeld-Beleuchtungseinrichtung (Dolan-Jennes, Lawrence, USA) unter Verwendung von Ilford-Delta100 Filmmaterial (Ilford, Mobberley, England).

2.7 Stimulation kultivierter Astrozyten mit Neuregulin- α und - β

Um Proliferation und Apoptose kultivierter Astrozyten in Reaktion auf Neuregulin-1 α - und β -Isoformen zu untersuchen, wurden je ca. 20.000 primäre Astrozyten pro Vertiefung einer 96-Loch-Zellkulturschale in 200 μ l Astrozytenmedium ausgesät. Nach einem Tag bei 37 °C im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt und 200 μ l serumfreies Medium mit 250 ng/ml Heregulin- α oder - β 1 (R&D Systems, Wiesbaden), gelöst in sterilem PBS mit 0,1 % BSA (Sigma, Deisenhofen), zugegeben. Kontrollen wurden in serumfreiem Medium mit 5 μ l BSA (0,1 %) in PBS ohne Neuregulin-Zugabe angesetzt. Die weitere Behandlung und die Dauer der Stimulation waren bei der Bestimmung der Apoptoserate und der Proliferationsrate unterschiedlich.

2.7.1 Apoptose-Test

Nach 6 Std., 24 Std., 3 Tagen und 6 Tagen Stimulation wurde jeweils die Apoptoserate der Astrozyten bestimmt. Bei Stimulationen von mehr als drei Tagen Dauer wurde nach diesem Zeitraum ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach den bestimmten Stimulationszeiten wurden das Medium von den Zellen abgesaugt, 100 μ l Trypsin (0,25 % in PBS; Gibco Life Technologies, Rockville, USA) zugegeben und die Zellen für 20 Min. im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde mikroskopisch überprüft, ob sich alle Zellen vom Schalenboden gelöst hatten. Die Trypsinisierung wurde durch die Zugabe von 100 μ l Astrozytenmedium gestoppt. Anschließend wurden 5 μ l Annexin-V, FITC-konjugiert (IQ-Products, Groningen, Niederlande), zugegeben und für 30 Min. auf Eis im Dunkeln inkubiert, um eine Bindung des Annexins-V an Phosphatidylserin in Membranen apoptotischer Zellen zu ermöglichen. In der Zwischenzeit wurde in FACS



(Fluorescent activated cell sorter)-Röhrchen je 1 μ l Propidiumiodid (0,1 μ g/ μ l) und 10.000 rotfluoreszente Calibrite-Beads (Becton-Dickinson, Heidelberg) vorgelegt. Die Zellsuspensionen wurden in die FACS-Röhrchen überführt und bis zur Analyse auf Eis im Dunkeln gelagert. Die Anzahl lebender, apoptotischer und toter Zellen wurde mit einem FACScalibur (Becton-Dickinson, Heidelberg) gezählt. Zellen konnten hierbei aufgrund ihrer Größe und Granulosität von Zellbruchstücken unterschieden werden, tote Zellen durch die Einlagerung von Propidiumiodid und die damit verbundene Erkennung durch den Rot- und den Gründetektor, apoptotische durch die grüne Fluoreszenz des FITC-konjugierten Annexins-V und die Calibrite-Beads durch ihre Rotfluoreszenz und geringe Größe. Insgesamt wurden 5.000 gemessene Ereignisse anhand dieser Charakteristika auf die verschiedenen zu messenden Populationen verteilt (Abb. 2.5).

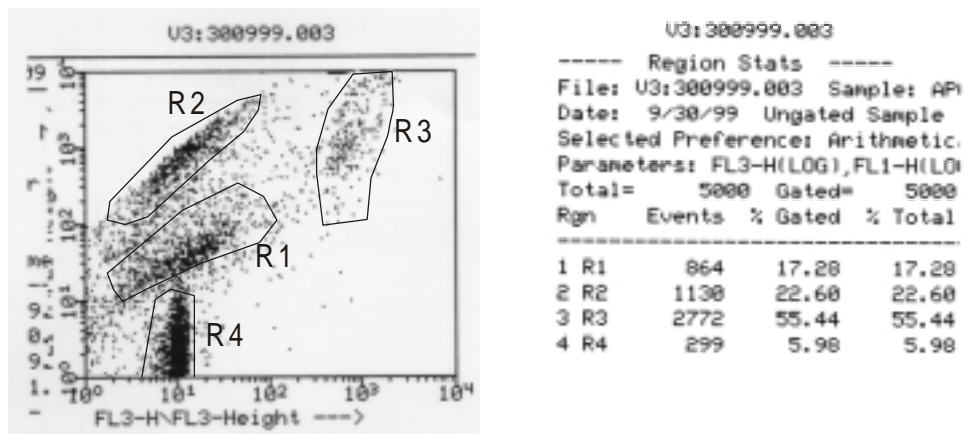


Abb. 2.5 Beispiel einer FACS (Fluorescent activated cell sorter)-Auswertung Neuregulin-stimulierter Astrozytenkulturen. Der Dot-Plot auf der linken Seite zeigt die Verteilung der gemessenen Ereignisse. Auf der x-Achse ist die Rotfluoreszenz (FL3) aufgetragen, auf der y-Achse Grünfluoreszenz (FL2). R1 markiert die Population lebender Zellen, R2 grünfluoreszente apoptotische Zellen, R3 tote Zellen, die durch die Propidiumiodid-Einlagerung sowohl vom Rot- als auch vom Gründetektor erkannt wurden, und R4 die scharf umrissene Population der rotfluoreszenten Kügelchen, die als Mengenstandard zugegeben worden waren. Auf der rechten Seite ist die Anzahl der gemessenen Ereignisse (Events) jeder der vier Populationen, bei 5.000 insgesamt gemessenen Ereignissen, angegeben. Diese Zahlen bildeten die Grundlage aller weiteren Berechnungen. Die Zahl der lebenden und apoptotischen Zellen wurde für die Berechnung der Apoptoserate verwendet, die Zahl der lebenden Zellen wurde außerdem für die Bestimmung der Proliferationsrate benötigt.



Durch Standardisierung gegen die gezählten Calibrite-Beads konnte die absolute Zellzahl jeder dieser Populationen auf das Gesamtvolumen der Zellsuspension berechnet werden. Die Apoptoserate der stimulierten Astrozyten wurde in Prozent der Gesamtzellzahl (lebend und apoptotisch) bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden graphisch aufgetragen. Die Anzahl lebender Zellen wurde außerdem benötigt, um die Proliferationsrate der behandelten Zellen zu bestimmen.

2.7.2 Proliferations-Test

Die Proliferation Neuregulin-stimulierter Astrozyten wurde nach 1 Tag, 3 Tagen und 6 Tagen bestimmt. Jeweils 24 Std. vor Ablauf der Stimulationsdauer wurde den Zellen 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin (Amersham Pharmacia, Freiburg) zugegeben, das in die DNA sich teilender Zellen eingebaut wird. Über die radioaktive Inkorporation kann somit die Proliferation gemessen werden kann. Die Zellen wurden mit 20 μl SDS (10 %) lysiert und mit einem Micromat 196 Harvester (Packard Instrument, Meriden, USA) geerntet. Hierbei wird die DNA der lysierten Zellen auf einer Membran aufgefangen, anschließend durch 2minütige Hitzebehandlung in einem Mikrowellenofen auf der Membran fixiert und mit einem Matrix 9600 Direct Beta Counter (Packard Instrument, Meriden, USA) gemessen. Diese Bestimmung der radioaktiven Inkorporation wurde durch die Anzahl lebender Zellen nach gleicher Neuregulin-Behandlung und Dauer (siehe 1.6.1) geteilt und der Mittelwert berechnet, um den mittleren radioaktiven Einbau in cpm/Zelle zu berechnen. Um die Signifikanz der beobachteten Änderungen zu überprüfen, wurde der Student's t-Test eingesetzt. Verglichen wurden die radioaktiv Inkorporation der α -, bzw. β -Neuregulin-stimulierten Astrozytenkulturen mit dem der unbehandelten Kontrollkulturen.



3 Ergebnisse

3.1 Klonierung und Sequenzierung der Neuregulin-1 Typ-II und -III N-Termini

Da keine rattenspezifischen Sequenzen der N-terminalen, und damit Typ-spezifischen Bereiche von Neuregulin-1 Typ-II und -III in den Datenbanken zu finden waren, wurden diese Sequenzen selbst isoliert und sequenziert. Dazu wurden anderweitig publizierte Primer für Typ-II verwendet (Shah et al., 1994), bzw. human-spezifische für Typ-III. Mit beiden Primerpaaren wurde RT-PCR mit Gesamthirn-cDNA der Ratte durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden kloniert und das spezifische, in den Vektor inserierte Fragment sequenziert. Je 2 unabhängig voneinander erhobene Sequenzen des gleichen Inserts wurden verglichen und stellten sich als identisch heraus. Die beiden Sequenzen wurden bei der Konstruktion der Neuregulin-1 Typ-spezifischen Primer für die semiquantitativ RT-PCR zugrunde gelegt.

Die beiden Ratten-Sequenzen unterscheiden sich entscheidend von den entsprechenden humanen Sequenzen, wie ein speziesübergreifender Vergleich zeigte (Abb. 3.5 A, B). Auch für andere Spezies sind große Sequenzunterschiede im N-terminalen Bereich von Neuregulin-1 zu beobachten, während der C-Terminus des Proteins hochkonserviert ist.

A Neuregulin-1 Typ-II

hs-n	501	GGTGGTGATC	GAGGGAAAGG	TGCACCCGCA	GCGGCGGCAG	CAGGGGGGCAC
rn-n	01	GGCGGTGATC	GAGGGAAAGG	TGCACCCGCC	GCGGCGGCAG	CAGGGGGGCAC
hs-p		V V I	Q G K	V H P Q	R R Q	Q G A
rn-p		A		P		
hs-n	551	TCGACAGGAA	GGCGGCGGCG	GCGGCGGGCG	AGGCAGGGGC	GTGGGGCGGC
rn-n	51	TCGACAGGAA	GGCAGCAGGC	GAGGCAGGGG	CAGGGGCGCG	GGACCAGCCC
hs-p		L D R K	A A A	A A G	E A G A	W G G
rn-p			G	E	A A R	D Q P
hs-n	601	GATCGCGAGC	CGCCAGCCGC	GGGCCCACGG	GCGCTGGGGC	CGCCCGCCGA
rn-n	101	GTCCAGGACT	CGCCACCTTC	ACAGGACCCT	CTGCCTGCTG	TCAACTGGAC
hs-p		D R E	P P A A	G P R	A L G	P P A E
rn-p		V Q D	P S	Q D P	L P A	V N W T



Ergebnisse: Klonierung und Sequenzierung der Neuregulin-1 Typ-II und -III N-Termini

hs-n	651	GGAGCCGCTG	CTCGCCGCCA	ACGGGACCGT	GCCCTCTTGG	CCCACCGCCC
rn-n	151	CCTGCCCCACT	GGGGGCCCCG	AGCCCAGCAC	CGATCAGCCC	GGGGACCC-
hs-p		E P L L A A	N G T V	P S W	P T A	
rn-p		L T G G P	E P S T	D Q P	G D P	
hs-n	701	CGGTGCCCAG	CGCCGGCGAG	CCCGGGGAGG	AGGCGCCCTA	TCTGGTGAAG
rn-n	200	-----	-----	-----	GCGCCCTA	TCTGGTCAAG
hs-p		P V P S	A G E	P G E	E A P Y	L V K
rn-p						
hs-n	751	GTGCACCAGG	TGTGGGCGGT	GAAAGCCGGG	GGCTTGAAGA	AGGACTCGCT
rn-n	219	GTGCACCAGG	TGTGGGCTGT	GAAAGCCGGG	GGTTTGAAGA	AGGACTCGCT
hs-p		V H Q	V W A V	K A G	G L K	K D S L
rn-p						
hs-n	801	GCTCACCGTG	CGCCTGGGGA	CCTGGGGCCA	CCCCGCCTTC	CCCTCCTGCG
rn-n	269	ACTCACCGTG	CGCCTGGATA	CCTGGGGCCA	CCCAGCCTTC	CCGTCTGCG
hs-p		L T V	R L G	T W G H	P A F	P S C
rn-p			I			
hs-n	851	GGAGGCTCAA	GGAGGACAGC	AGGTACATCT	TCTTCATGGA	GCCCCACGCC
rn-n	319	GGGGGCTCAA	GGAGGACAGC	AGGTTTCAT		
hs-p		G R L K	E D S	R T		
rn-p				F		

B Neuregulin-1 Typ-III

hs-n	701	GAGAGGTTGC	CTCAACTCAG	AGAAAATCTG	CATTGTCCCC	ATCCTGGCTT
rn-n	01					CCTGGCTT
hs-p						L A
rn-n						
hs-n	751	GCCTGGTCAG	CCTCTGCCTC	TGCATGCGG	GCCTCAAGTG	GGTATTTGTG
rn-n	09	GCCTGGTCAG	CCTCTGCCTC	TGCATGCTG	GCCTGAAGTG	GGTATTTGTG
hs-p		C L V S	L C L	C I A	G L K W	V F V
rn-p						
hs-n	801	GACAAGATCT	TTGAATATGA	CTCTCCTACT	CACCTTGACC	CTGGGGGGTT
rn-n	59	GACAAGATAT	TTGAATACGA	CTCTCCTACC	CACCTTGACC	CTGGGGGGTT
hs-p		D K I	F E Y D	S P T	H L D	P G G L
rn-p						
hs-n	851	AGGCCAGGAC	CCTATTATTT	CTCTGGACGC	AACTGCTGCC	TCAGCTGTGT
rn-n	109	AGGCCAGGAC	CCTGTGATTT	CTCTGGATCC	AACTGCTGCC	CCAGCCATTT
hs-p		G Q D	P I I	S L D A	T A A	S A V
rn-p			V			I
hs-n	901	GGGTGTCGTC	TGAGGCATAC	ACTTCACCTG	TCTCTAGGGC	TCAATCTGAA
rn-n	159	TGGTATCATC	TGAGGCATAC	ACTTCACCTG	TCTCTAAGGC	TCAGTCTGAA
hs-p		W V S S	E A Y	T S P	V S R A	Q S E
rn-p		L			K	S
hs-n	951	AGTGAGGTTTC	AAGTTACAGT	GCAAGGTGAC	AAGGCTGTTG	TCTCCTTTGA
rn-n	209	GCTGGGGCTC	ATGTTACAGT	ACAAGGTGAC	CATGCTGCTG	TGGCCTCTGA
hs-p		S D V	Q V T V	Q G D	K A V	V S F E
rn-p		A G A	M		H A	S



Ergebnisse: Neuregulin-1 und seine Rezeptoren im adulten Gehirn

hs-n	1001	ACCATCAGCG	GCACCGACAC	CGAAGAATCG	TATTTTGTGCC	TTTTCTTTCT
rn-n	259	ACCTTCAGCA	GTACCGACCC	GGAAGAACCG	GCTGTCTGCT	TTTCCTCCCT
hs-p		P S A	S P T	P K N R	I F A	F S F
rn-p			L	R	L S	P P
hs-n	1051	TGCCGTCCAC	TGCGCCATCC	TTCCCTTCAC	CCACCCGGAA	CCCTGAGGTG
rn-n	309	TTCACTCTAC	TGCACCGCCC	TTCCCTTCTC	CAGCTCGGAC	CCCTGAGCC-
hs-p		L P S T	A P S	F P S	P T R N	P E V
rn-p		F H	P		L A T	
hs-n	1101	AGAACGCCCA	AGTCAGCAAC	TCAGCCACAA	ACAACAGAAA	CTAATCTCCA
rn-n		-----	-----	-----	-----	-----
hs-n	1151	AACTGCTCCT	AAACTTTCTA	CATCTACATC	CACCACTGGG	ACAAGCCATC
rn-n	358	-----	-----A	CATCAACATC	CACCACTGGG	ACCAGCCATC
hs-p				T S T S	T T G	T S H
rn-p						
hs-n	1201	TTGTAAATG	TGCGGAGAAG	GAGAAAACCT	TCTGTGTGAA	TGGAGGGGAG
rn-n	389	TCATAAAGTG	TGCGGAGAAG	GAGAAAACCT	TCTGTGTGAA	TGGGGGCGAG
hs-p		L V K C	A E L	E K T	F C V N	G G E
rn-p		I				
hs-n	1251	TGCTTCATGG	TGAAAGACCT	TTCAAACCCC	TCGAGATACT	TGTGCAAGTG
rn-n	439	TGCTTCACGG	TGAAGGACCT	GTCAAACCCG	TCAAGATACT	TGTGCAAGTG
hs-p		C F M	V K N L	S N P	S R Y	L C K C
rn-p		T				
hs-n	1301	CCCAAATGAG	TTTACTGGTG	ATCGCTGCCA	AAACTACGTA	ATGGCCAGCT
rn-n	489	CCCAAATGAG	CTTACTGGTG	ATCGTTGCCA	AAACTACGTA	ATGGCCAGCT
hs-p		P N Q	F T G	D G C Q	N Y V	
rn-p			L			
hs-n	1351	TCTACAGTAC	GTCCACTCCC	TTTCTGTCTC	TGCCTGAATA	GGAGCATGCT
rn-n	539	TC				

Abb. 3.5 Alignment der RNA-Sequenzen des N-terminalen Bereichs von Neuregulin-1 Typ-II (A) und Typ-III (B) aus Mensch (hs-n; Nukleotide 501-900 der Sequenz: HUMGGF2A aus der GenEMBL-Genbank) und Ratte (rn-n; eigener Klon, Nukleotide 1-346). Unterschiede in der Nukleotidsequenz der beiden Spezies sind grau unterlegt. Die Aminosäuresequenz des Ratten-Proteins (rn-p) wurde nur dann angegeben, wenn sie sich von der des humanen Proteins (hs-p) unterschied.

3.2 Neuregulin-1 und seine Rezeptoren im adulten Gehirn

3.2.1 Neuregulin-1 Verteilung im adulten Gehirn

3.2.1.1 Immunhistochemie

Immunhistochemische Markierung verschiedener Hirnregionen mit einem pan-Neuregulin-1 Antikörper zeigte sowohl neuronales als auch gliales Signal. Im Vorderhirn waren kortikale Neurone und die Pyramidenzellschicht des Hippo-



campus ebenso positiv wie die Körnerzellschicht und die polymorphe Schicht des Gyrus dentatus (Abb. 3.1 A, B). Aber auch eine Unterpopulation GFAP-positiver kortikaler und hippocampaler Astrozyten zeigte Neuregulin-1-artige Immunreaktivität (Abb. 3.1 B, C). Außerdem war eine deutliche Markierung des den Ventrikel auskleidenden Ependyms und des Plexus choroideus sichtbar (Abb. 3.1 A). Ein ähnliches Bild stellte sich im Hirnstamm und Kleinhirn dar. Im Cerebellum waren die Körnerzellschicht und die Purkinjezellschicht positiv, ebenso Neurone in der Molekularschicht (Abb. 3.2 A, B) und in einzelnen tiefen Kerngebieten der weißen Substanz (Abb. 3.2 A). Auch hier war eine Subpopulation von Astrozyten, in der Körnerzellschicht (Abb. 3.2 B, C) und im Mark (nicht gezeigt) lokalisiert, zu sehen. Außerdem wiesen Bergmann-Gliazellen in der Molekularschicht eine deutliche Immunreaktivität auf (Abb. 3.2 A, B, C). Im Hirnstamm waren Neurone vieler Kerngebiete markiert, ebenso wiederum eine Subpopulation von Astrozyten. Auch hier war das Ependym des Ventrikels und der Plexus choroideus deutlich sichtbar (Abb. 3.3 A).

Abb. 3.1 (nächste Seite) Im Vorderhirn weisen sowohl kortikale als auch hippocampale Neurone Neuregulin-1 Immunreaktivität auf (A zusammengesetztes Bild aus konfokalen Aufnahmen). Eine stärkere Vergrößerung der Pyramidenzellschicht und des Pars oriens zeigen, daß außer den Neuronen auch eine Subpopulation GFAP-positiver Astrozyten (C) Neuregulin-1-positiv ist (B; Pfeile). Die Abbildungen D und E stellen Dunkelfeldaufnahmen des Hippocampus von Neuregulin Typ-I (D) und Typ-II (E) Autoradiographien dar. In beiden Fällen sind Neurone der verschiedenen hippocampalen Schichten positiv, im Fall der Neuregulin-1 Typ-I Hybridisierung können zusätzlich Astrozyten gefunden werden (D; Pfeile).



Abb. 3.2 (nächste Seite) Immunhistochemische Markierung des Kleinhirns mit einem pan-Neuregulin-1 Antikörper zeigt Signal in der Körnerzellschicht (k), der Purkinjezellschicht (p) und in Neuronen der Molekularschicht (m) (A, B). Außerdem weisen auch GFAP-positive Astrozyten und Bergmann-Gliazellen (C) Neuregulin-1 Immunreaktivität auf (B). In-situ-Hybridisierung zeigt sowohl Neuregulin-1 Typ-I (D) als auch Typ-II (E) Signal in der Körnerzellschicht, der Purkinjezellschicht und Molekularschicht.

Abb. 3.3 (übernächste Seite) Neuregulin-1 Immunreaktivität kann in vielen Kerngebieten des Hirnstamms detektiert werden (A). Dunkelfeld-Aufnahmen von In-situ-Hybridisierungen mit Neuregulin-1 Typ-I (B), Typ-II (C) und Typ-III (D) Ribonukleotidsonden zeigen, daß ein Großteil des Signals auf Proteinebene auf die ersten beiden Neuregulin-1 Typen zurückzuführen ist. In drei großen Kerngebieten, dem Fazialiskern, dem retikulären gigantozellulären Kern und dem spino-vestibulären Kern, sind sie jedoch mit dem Typ-III koexprimiert (D). Die Lage dieser Kerngebiete wird durch die Skizze E verdeutlicht.



3.2.1.2 Westernblot-Analyse von Neuregulin-1

Um einerseits sicherzustellen, daß der in der Immunhistochemie verwendete pan-Neuregulin-1 Antikörper das Zielprotein korrekt erkennt, und um andererseits die zelluläre Verteilung des Proteins zu untersuchen, wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Als Ausgangsmaterial für die elektrophoretische Protein-Auftrennung wurden Lysate aus Gesamthirn und Astrozytenkulturen, sowie rekombinantes Neuregulin-1 Protein verwendet. Nach Markierung mit dem Neuregulin-1 Antikörper konnte eine Vielzahl an Banden verschiedenster Größen in den beiden Lysaten gefunden werden. Auch das rekombinante Neuregulin-1 Protein wurde korrekt erkannt. (Abb. 3.4). Da der Antikörper im Westernblot jedoch sehr viele Banden erkennt, deren Zuordnung zu bestimmten Isoformen des Proteins unmöglich war, eignete sich diese Methode nicht für die weitere Analyse isoform-spezifischen Neuregulin-1 Expression im Gehirn.

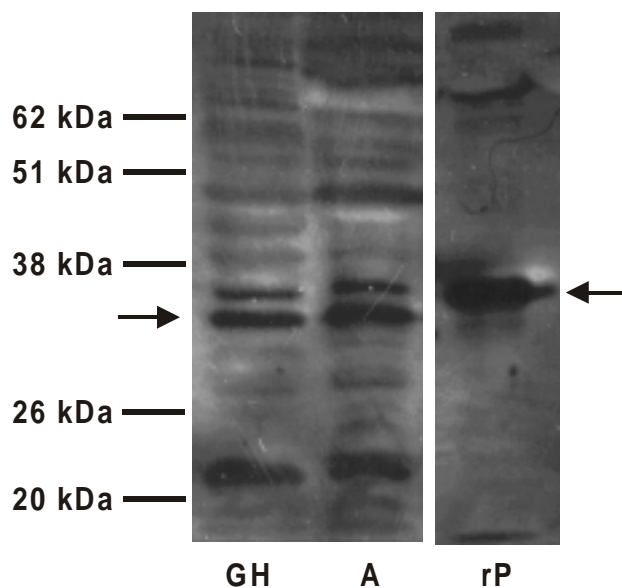


Abb. 3.4 Westernblot mit pan-Neuregulin-1 Markierung auf Lysaten von Gesamthirn (GH) und Astrozyten (A), sowie rekombinatem Neuregulin-1 Protein (rP). Das rekombinante Protein wird korrekt erkannt, auf gleicher Höhe sind auch Doppelbanden in den Lysaten markiert (Pfeile), die wahrscheinlich Neuregulin-1 darstellen. Auch ein Teil der anderen Banden dürfte auf verschiedene Neuregulin-1 Isoformen zurückzuführen sein. Jedoch ist es nicht möglich, klare Aussagen über die exprimierten Isoformen zu treffen.

3.2.1.3 *In-situ*-Hybridisierung

Um die auf Proteinebene festgestellte Neuregulin-1 Expression im adulten Gehirn verschiedenen Neuregulin-1 Typen zuordnen zu können, wurden *In-situ*-Hybridisierungen mit Neuregulin-Typ-spezifischen Proben durchgeführt. Durch Verwendung von Schnitten der gleichen Hirnregionen wie in der Immunhistochemie



konnte gezeigt werden, daß kortikale, hippocampale und cerebellare Neurone Neuregulin-1 der Typen-I und -II exprimierten (Abb. 3.1 D, E; Abb. 3.2 D, E), jedoch nicht des Typs-III. Auch ein Großteil der Neurone des Hirnstamms waren ausschließlich Typ-I und -II-positiv (Abb. 3.3 B, C). Einige Kerngebiete, z. B. der Fazialiskern, der retikuläre gigantozelluläre Kern und der spino-vestibuläre Kern, zeigten in ihren Neuronen eine starke Neuregulin-1 Typ-III Expression (Abb. 3.3 D), koexprimiert mit Typ-I und -II.

Die immunhistochemisch detektierte Neuregulin-1 Expression in einer Subpopulation von Astrozyten konnte durch *In-situ*-Hybridisierung ausschließlich dem Typ-I zugeordnet werden. Besonders deutlich war diese astrozytäre Typ-I-Markierung in der Molekularschicht des Hippocampus zu beobachten (Abb. 3.1 C).

3.2.1.4 RT-PCR

Um die *in situ* untersuchte Neuregulin-1 Typen-Verteilung zu überprüfen, und um weiteren Aufschluß über die Zusammensetzung der exprimierten Isoformen zu erhalten, wurde RT-PCR mit cDNA aus unterschiedlichen Hirnregionen und Zelltypen durchgeführt. Hierfür wurden Primer gegen die drei verschiedenen, bekannten N-Termini des Neuregulin-1 Gens konstruiert, ebenso gegen die Ig-ähnliche Domäne, den gemeinsamen Teil der EGF-ähnlichen Domäne, die spleiß-spezifischen Sequenzen von α und β und gegen die verschiedenen Kombinationen aus EGF-ähnlicher Domäne und den Spleißvarianten der Juxtamembrandomäne (Abb. 3.6). Mit unterschiedlichen Primer-Kombinationen konnten die verschiedenen Neuregulin-1 Typen und Spleißvarianten der EGF-ähnlichen und Juxtamembrandomäne detektiert werden. Auch die Untersuchung der verschiedenen Typ-Spleiß-Kombinationen war möglich. Die in diesen Experimenten verwendeten regionsspezifischen cDNAs wurden aus RNA des Gesamthirns, des Kortex und kultivierter Neuronen der Substantia nigra synthetisiert. Zellspezifische cDNA wurde aus direkt isolierten Motoneuronen und primären Astrozyten- bzw. Mikroglia-kulturen gewonnen. Die Qualität und relative Konzentration der verschiedenen cDNAs wurden durch eine RT-PCR mit Primern gegen Cyclophilin-A überprüft. Cyclophilin-A ist ein "Housekeeping"-Gen, das



zelltyp-, zellzyklus- und aktivitätsunabhängig exprimiert und daher als Standard verwendet werden kann.

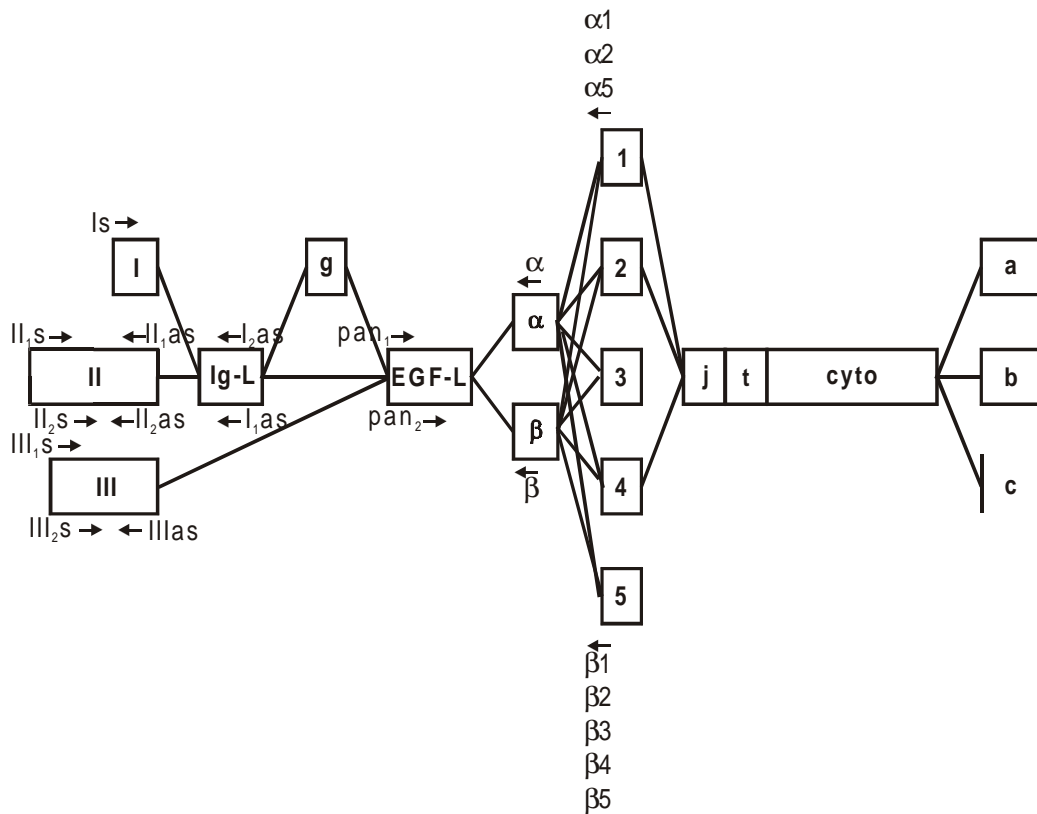


Abb. 3.6 Anordnung der zur Analyse der Neuregulin-1 Isoformen-Verteilung verwendeten Primer am Modell des Proteins mit seinen verschiedenen Typen und Spleißvarianten. Dieselben Primer fanden auch bei der Analyse der Expressionsregulierung im Fazialis-kern nach peripherer Läsion des Nervs Anwendung.

Unter Verwendung von Neuregulin-1 typspezifischen Primerpaaren konnte gezeigt werden, daß mRNAs mit allen drei N-Termini im adulten Gehirn vorliegen. Alle drei Neuregulin-1 Typen konnten auch in cDNA gefunden werden, die aus dem Kortex oder aus Motoneuronen des Rückenmarks gewonnen worden war. In Neuronen der Substantia nigra konnten die Typen-II und -III nachgewiesen werden, in Astrozyten in erster Linie Typ-I, aber auch ein sehr schwaches Typ-III-Signal. In Mikroglia-cDNA wurde keiner der Neuregulin-1 N-Termini gefunden. Mit Primerpaaren, die gegen die spleißspezifischen C-terminalen Bereiche der EGF-ähnlichen Domäne gerichtet waren, konnte Neuregulin-1-α im Gesamthirn und



Kortex ebenso nachgewiesen werden wie in Astrozyten und Motoneuronen. Lediglich in Substantia nigra Neuronen und Mikroglia war diese Spleißvariante nicht detektiertbar. Die β -Variante der EGF-ähnlichen Domäne war ebenfalls in Gesamthirn, Kortex und in Neuronen der Substantia nigra stark exprimiert, jedoch nur weit schwächer in Astrozyten. In Mikroglia war der β -Spleiß ebensowenig vorhanden wie der α -Spleiß. Somit konnte weder ein N-Terminus noch die zentrale, EGF-ähnliche Domäne in Mikrogliazellen nachgewiesen werden (Abb. 3.7).

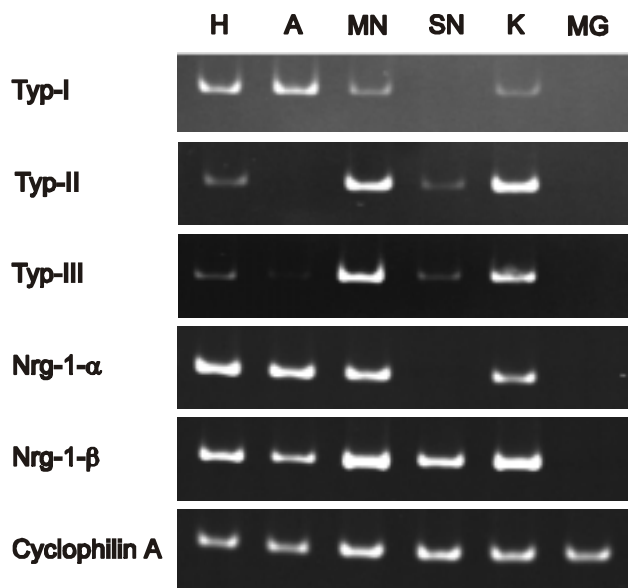


Abb. 3.7 Verteilung der drei Neuregulin-1 Typen (Typ-I, -II und -III) und des α - und β -Spleißes der EGF-ähnlichen Domäne im Gesamthirn (H), in Astrozyten (A), Motoneuronen (MN), Substantia nigra Neuronen (SN), Kortex (K) und Mikroglia (MG), ermittelt mit RT-PCR unter Verwendung spezifischer cDNAs. Um die Vergleichbarkeit der Konzentrationen der verschiedenen cDNAs sicherzustellen, wurde eine RT-PCR mit Primern gegen das Housekeeping-Gen Cyclophilin A durchgeführt.

Um die exakten α - bzw. β -Isoformen zu untersuchen, die in den verschiedenen Hirnregionen und Zelltypen exprimiert werden, wurden 3'-Primer eingesetzt, die die Exongrenze zwischen α - bzw. β -Spleiß und den juxtamembranen Spleißvarianten überbrückten (Abb. 3.6). Durch die Kombination dieser Primer mit einem pan-Neuregulin-1-Primer konnten drei distinkte α -Isoformen und alle fünf theoretisch möglichen β -Isoformen gefunden werden. Die Isoform α_1 konnte ausschließlich in Motoneuronen detektiert werden, α_2 in Motoneuronen, im Gesamthirn und in Astrozyten. α_2 stellte die einzige Neuregulin-1 Isoform dar, die überhaupt in astrozytärer cDNA detektiert werden konnte, da der mit dem pan- β -Primer detektierte β -Spleiß der EGF-ähnlichen Domäne (Abb. 3.7) mit keinem der spezifischen Primer wiedergefunden werden konnte. Die dritte α -Isoform, die



nachgewiesen werden konnte, war $\alpha 5$, exprimiert im Gesamthirn und Kortex ebenso wie in Motoneuronen. Die β -Isoformen, die nachgewiesen werden konnten, zeigten größtenteils ein weiter gestreutes Expressionsmuster. Die Isoform $\beta 1$ wurde in allen Hirnregionen und Zelltypen außer Astrozyten und Mikroglia gefunden, ebenso $\beta 3$. Neuregulin-1- $\beta 2$ war im Gesamthirn, in Motoneuronen und im Kortex nachweisbar, $\beta 4$ und $\beta 5$ nur in Motoneuronen und im Kortex.

	Gesamt hirn	Astrozyten	Moto neurone	Sub. nigra	Kortex	Mikroglia
$\alpha 1$	-	-	+	-	-	-
$\alpha 2$	+	+	+	-	-	-
$\alpha 5$	+	-	+	-	+	-
$\beta 1$	+	-	+	+	+	-
$\beta 2$	+	-	+	-	+	-
$\beta 3$	+	-	+	+	+	-
$\beta 4$	-	-	+	-	+	-
$\beta 5$	-	-	+	-	+	-

Tab. 3.1 *Expressionsmuster von Spleißkombinationen der EGF-ähnlichen und Juxta-membrandomäne von Neuregulin-1 in verschiedenen Hirnregionen und Zelltypen. Die Verteilung wurde mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene unter Anwendung spleißspezifischer Primer untersucht.*

Zur Analyse der Typ-Zugehörigkeit der verschiedenen Spleißvarianten wurde der pan-Neuregulin-1 Primer durch einen typspezifischen ersetzt und ebenfalls mit den Spleißkombinations-spezifischen Primern kombiniert. Das astrozytäre Signal konnte als Neuregulin-1 Typ-I- $\alpha 2$ identifiziert werden. Im Gegensatz zu dieser einzelnen Isoform in Astrozyten konnte eine Vielzahl neuronaler Neureguline gefunden werden. Einige, wie z. B. Typ-I- $\beta 1$ und Typ-III- $\beta 1$, kamen im Gesamthirn ebenso vor wie im Kortex und in Motoneuronen, andere, wie Typ-I- $\beta 4$ und Typ-III- $\beta 5$, ausschließlich in Motoneuronen. In kultivierten Substantia nigra Neuronen konnten nur drei Neuregulin-Varianten gefunden werden, und zwar Typ-II- $\beta 1$, - $\beta 2$ und Typ-III- $\beta 1$ (Tab. 3.2). Dieses deckte sich mit den Ergebnissen der vorherigen



Versuchsreihen, daß in diesem Zelltyp kein Neuregulin-1 Typ-I und keine α -Spleißvariante der EGF-ähnlichen Domäne exprimiert werden.

In einigen Experimenten war den distinkten α -und β -Spleißvarianten, die durch die Primerkombination mit einem pan-Neuregulin-1 gefunden wurden, keine spezifische Typ-Zugehörigkeit zuzuordnen.

	Gesamt hirn	Astrozyten	Moto neurone	Sub. nigra	Kortex	Mikroglia
I- α 2	+	+	-	-	-	-
I- β 1	+	-	+	-	+	-
I- β 3	+	-	-	-	+	-
I- β 4	-	-	+	-	-	-
II- β 1	+	-	-	+	+	-
II- β 2	-	-	-	+	+	-
III- α 2	+	-	-	-	-	-
III- β 1	+	-	+	+	+	-
III- β 2	+	-	+	-	+	-
III- β 3	+	-	+	-	+	-
III- β 4	-	-	+	-	-	-
III- β 5	-	-	+	-	-	-

Tab. 3.2 Verteilung distinkter mRNAs für Neuregulin-1 Isoformen in verschiedenen Hirnregionen und Zelltypen. Die Expressionsmuster wurden mittels RT-PCR mit verschiedenen Kombinationen Neuregulin-Typ-spezifischer Sense-Primer und Spleißvarianten-spezifischer Antisense-Primer analysiert.

3.2.2 Verteilung von erbB-2, erbB-3 und erbB-4 im adulten Gehirn

RT-PCR auf hirnregions- und zellspezifischen cDNAs wurde auch zur Detektion des Expressionsmusters der verschiedenen Neuregulin-1 Rezeptoren verwendet. Hierbei fanden Primerpaare, die spezifisch gegen erbB-2, erbB-3 oder erbB-4 gerichtet waren, Anwendung. Alle drei Tyrosinkinase konnten im GesamthirncDNA ebenso gefunden werden wie im Kortex, in Motoneuronen, in Substantia nigra Neuronen und Astrozyten. Jedoch nur einer der Rezeptoren, erbB-3, wurde in Mikroglia detektiert.



	Gesamt hirn	Astrozyten	Moto neurone	Sub. nigra	Kortex	Mikroglia
erbB-2	+	+	+	+	+	-
erbB-3	+	+	+	+	+	+
erbB-4	+	+	+	+	+	-

Tab. 3.3 Expression der Rezeptor Tyrosinkinasen erbB-2, erbB-3 und erbB-4 im adulten Gehirn und in verschiedenen Zelltypen, untersucht mit RT-PCR. Alle drei in die Neuregulin-1-erbB-Signaltransduktion involvierten Rezeptoren weisen eine ubiquitäre Expression in allen untersuchten Zelltypen außer Mikroglia auf. In dieser konnte ausschließlich erbB-3 detektiert werden.

3.3 Stimulation kultivierter Astrozyten mit Neuregulin-1 α - und β -Isoformen

Kultivierte Astrozyten zeigen Veränderungen in ihrer Morphologie und, bei langfristiger Stimulation, einen Anstieg der Zellzahl, wenn sie mit Neuregulin-1 β -Isoformen oder aus Gewebe isolierten Neuregulin-1 Extrakten behandelt werden (Pinkas-Kramarski et al., 1994; Rio et al., 1997). *In vivo* dürften Astrozyten ein wichtiges Ziel für neuronales Neuregulin darstellen, da Neuronen eine der Hauptquellen dieses Proteins im ZNS sind. Um die Wirkung von α -Neuregulin-1 im Vergleich zu den β -Varianten zu untersuchen, wurden Astrozytenkulturen für sechs Stunden, einen Tag, drei Tage und sechs Tage mit Heregulin- α , bzw. Heregulin- β -Peptiden behandelt. Diese Peptide bestanden jeweils aus der EGF-ähnlichen Domäne, die entweder den α -oder den β -Spleiß umfaßten, ohne weitere N- oder C-terminale Regionen. Peptide nur des rezeptorbindenden Bereichs von Neuregulin-1 wurden verwendet, um Sekundäreffekte auszuschließen, die z. B. durch die Bindung anderer sezernierter oder membranständiger Protein hervorgerufen werden können. Pro Peptid und Stimulationsdauer wurden acht Proben angesetzt. FACS-Analysen zeigten einen massiven Rückgang der Zellzahl sowohl α - als auch β -stimulierter Astrozyten bereits nach sechs Stunden Behandlung. Außerdem konnte eine erhöhte Apoptose bereits nach diesem Stimulationszeitraum in den Heregulin- β behandelten Zellen beobachtet werden. Die Apoptoserate wurde in Prozent der Gesamtzellzahl angegeben. Nach sechs Stunden Heregulin- β Stimulation waren 20 ± 6 % aller Zellen apoptotisch, im Vergleich zu 13 ± 3 % in



unstimulierten Kontrollzellen. Auch als Antwort auf Heregulin- α Stimulation stieg die Apoptoserate an, jedoch mit einer leichten Verzögerung. Nach einem Tag Stimulation mit Heregulin- α waren 18 ± 2 % apoptotischer Zellen zu beobachten, mit Heregulin- β 17 ± 3 % und in Kontrollzellen 13 ± 2 %. Im weiteren Versuchsverlauf stieg die Apoptoserate der unstimulierten Astrozyten an, wodurch nach sechs Tagen der Kultivierung in serumfreiem Medium keine Unterschiede der Apoptoseraten zwischen stimulierten und unbehandelten Zellen mehr zu beobachten waren (Abb. 3.8).

	Kontrolle	Nrg- α	Nrg- β
6 Std.	$13,38 \pm 2,53$	$14,85 \pm 2,27$	$20,20 \pm 5,73$
1 Tag	$13,06 \pm 1,78$	$17,49 \pm 1,89$	$17,30 \pm 3,39$
3 Tage	$27,97 \pm 4,55$	$29,06 \pm 4,26$	$32,63 \pm 3,48$
6 Tage	$29,87 \pm 3,77$	$30,06 \pm 5,88$	$27,77 \pm 9,25$

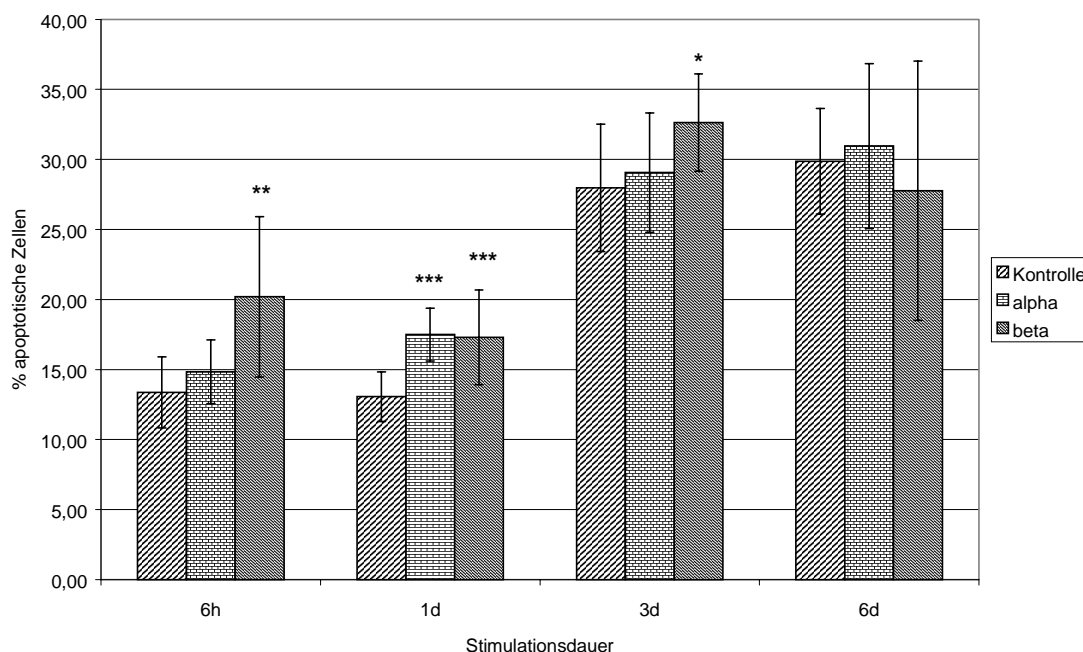


Abb. 3.8 Heregulin- α sowie - β induzieren eine Erhöhung der Apoptose kultivierter Astrozyten. Bereits nach sechs Stunden Stimulation kann ein deutlicher Anstieg der Apoptoserate in Heregulin- β stimulierten Kulturen beobachtet werden, nach einem Tag auch den Heregulin- α stimulierten. Bis zum sechsten Tag nimmt die Apoptose in unstimulierten Zellen so weit zu, daß kein Unterschied zwischen stimulierten und Kontrollzellen mehr beobachtet werden kann.



Wurde außer der Apoptoserate auch die Proliferationsrate der Astrozyten bestimmt, konnten ebenfalls Reaktionen auf beide Neuregulin-Isoformen beobachtet werden. Die Proliferationsrate wurde durch den Einbau radioaktiv-markierten Thymidins bestimmt, indem die inkorporierte Radioaktivität (in cpm) zur Anzahl lebender Zellen ins Verhältnis gesetzt wurde.

	Kontrolle	Nrg- α	Nrg- β
1 Tag	0,137 \pm 0,007	0,197 \pm 0,021	0,190 \pm 0,016
3 Tage	0,115 \pm 0,008	0,122 \pm 0,010	0,159 \pm 0,011
6 Tage	0,238 \pm 0,033	0,348 \pm 0,096	0,768 \pm 0,141

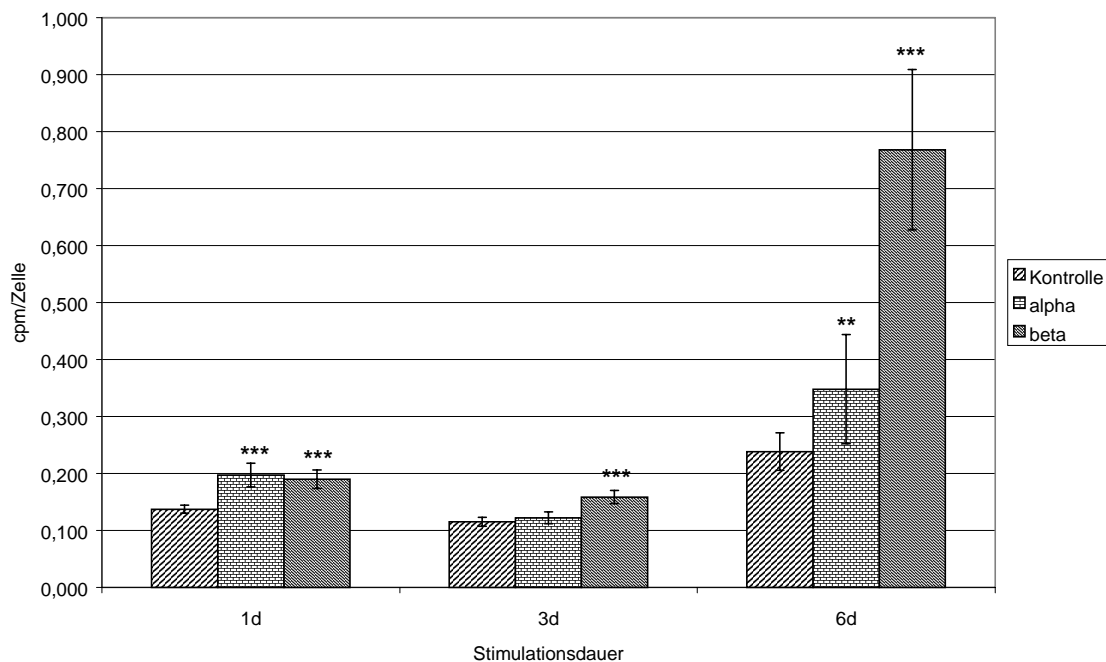


Abb.3.9 Die Proliferation primärer Astrozytenkulturen wird sowohl durch Heregulin- α als auch durch Heregulin- β erhöht im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen. Bereits nach einem Tag kann eine signifikante Zunahme des Einbaus radioaktiven Thymidins in Neuregulin-stimulierten Astrozyten gemessen werden mit einer Tendenz, weiter zuzunehmen. Doch während dieser Effekt in Folge von Heregulin- α Stimulation moderat bleibt, ist in Heregulin- β stimulierten Zellen am 6. Stimulationstag mehr als eine Verdreifachung der Proliferation im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten.



Bereits nach einem Tag war die Proliferation sowohl α -, als auch β -stimulierter Astrozyten, mit $0,197 \pm 0,021$ cpm/Zelle, bzw. $0,190 \pm 0,016$ cpm/Zelle deutlich erhöht im Vergleich zu $0,137 \pm 0,007$ cpm/Zelle in den unstimulierten Kontrollzellen. Die Proliferationsrate in Neuregulin-behandelten Zellen stieg weiter an, blieb im Falle von Heregulin- α Stimulation mit einer Erhöhung auf $0,348 \pm 0,096$ cpm/Zelle am sechsten Tag jedoch moderat verglichen mit $0,238 \pm 0,033$ cpm/Zelle in unbehandelten Astrozyten. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich die Proliferationsrate in Antwort auf β -Heregulin-Gabe dramatisch erhöht auf $0,768 \pm 0,141$ cpm/Zelle (Abb. 3.9).

3.4 Expression von Neuregulin-1 und erbB-Rezeptoren im Fazialiskern nach peripherer Läsion des Nervs

Wird der Fazialisnerv verletzt, kommt es zu morphologischen, zellulären und molekularen Veränderungen des im Hirnstamm lokalisierten Fazialiskerns. Diese Veränderungen können mit verschiedensten Methoden qualitativ und quantitativ untersucht werden.

3.4.1 Immunhistochemische Markierung von Neuregulin-1 im Fazialiskern nach peripherer Läsion

Ein pan-Neuregulin-1 Antikörper wurde auf Gewebeschnitten des Hirnstamms auf Höhe des Fazialiskerns appliziert (Abb. 3.10). Ab dem dritten postoperativen Tag konnte Signal in Gliazellen zwischen den Fazialis-Motoneuronen beobachtet werden (Abb. 3.10 B, D). Doppelmarkierungen mit einem GFAP-Antikörper zeigten, daß es sich um eine Subpopulation reaktiver Astrozyten handelte (Abb. 3.10 B, D). Die Zahl Neuregulin-1 positiver Astrozyten stieg bis zum siebten Tag weiter an und blieb dann circa eine Woche lang auf dem gleichen Level. Am Tag 28 nach der Operation waren nur noch vereinzelte Neuregulin-1 positive Astrozyten zu sehen (Verlauf nicht gezeigt). Im Fazialiskern der Kontrollseite waren über den gesamten Zeitraum lediglich einige perivaskuläre Astrozyten Neuregulin-1 positiv (Abb. 3.10 A, C). Auch in den Fazialis-Motoneuronen war Immunreaktivität zu beobachten, jedoch ohne deutliche Veränderung in Antwort auf die Läsion (Abb. 3.10 A, B).



Ergebnisse: Expression von Neuregulin-1 und erbB-Rezeptoren im Fazialiskern nach peripherer Läsion des Nervs

Abb. 3.10 (nächste Seite) Immunhistochemische Doppelmarkierung der Fazialiskerne der Kontroll- und der axotomierten Seite drei Tage nach peripherer Transektion des Nervus facialis. Sowohl Motoneurone (breite Pfeile) beider Seiten als auch einige wenige Astrozyten (schlanke Pfeile) der Kontrollseite und viel Astrozyten der axotomierten Seite weisen Neuregulin-1 Immunreaktivität auf (A, B). Anhand der GFAP-Markierung (C, D) ist zu erkennen, daß alle GFAP-positiven Astrozyten beider Seiten auch Neuregulin-1 enthalten, wenn auch nicht alle Fortsätze der Zellen gleich gut markiert sind.



3.4.2 Semiquantitative Untersuchung der isoformspezifischen Neuregulin-1 Expression im Fazialiskern nach peripherer Läsion des Nervs

Quantitative Änderungen der Expression der drei verschiedenen Neuregulin-1 Typen und der verschiedenen Spleißvarianten-Kombinationen der EGF-ähnlichen und Juxtamembrandomäne wurden mit Hilfe von semiquantitativer RT-PCR untersucht. Hierbei fanden die gleichen Primerpaare Anwendung wie bei der Untersuchung der Isoform-spezifischen Expression von Neuregulin-1 im intakten adulten Gehirn. Es wurde cDNA aus Fazialiskernen der operierten sowie der Kontrollseite verwendet, jeweils einen Tag, drei Tagen, sieben Tage, 14 Tage, 28 Tage und 56 Tage nach peripherer Axotomie des Fazialisnervs. Als Kontrolle diente cDNA aus den beiden Fazialiskernen unoperierter Tiere (0 Tage).

Semiquantitative RT-PCR mit Primern gegen Neuregulin-1 Typ-I zeigten eine starke Hochregulierung der Expression bereits einen Tag nach Axotomie. Es war ein Anstieg des mRNA-Levels um das 3,5-fache zu beobachten. Sieben Tage nach der Läsion war eine maximale Hochregulierung auf das 4-fache der Ausgangsmenge zu messen, die bis zum 56. Tag nach der Verletzung auf eine Verdoppelung zurückging (Abb. 3.11 A). Im Gegensatz zu dieser starken Expressionssteigerung des Typs-I in Antwort auf die periphere Verletzung änderte sich der mRNA-Level für Neuregulin-1 Typ-II kaum. Lediglich am Tag sieben nach Axotomie konnte ein leichtes Absinken der Expression beobachtet werden (Abb. 3.11 B). Die Expressionsrate des Typs-III im Fazialiskern sank nach einer Verletzung des Nervs dramatisch ab, leicht verzögert im Vergleich zur Hochregulierung des Typs-I. Drei Tage nach Axotomie war der mRNA-Level auf 1/5 des Ausgangswertes verringert. Danach stieg die Expressionsrate des Typs-III langsam wieder an, bis sie 56 Tage nach der Verletzung einen ähnlichen Wert erreichte wie am Tag eins (Abb. 3.11 C).

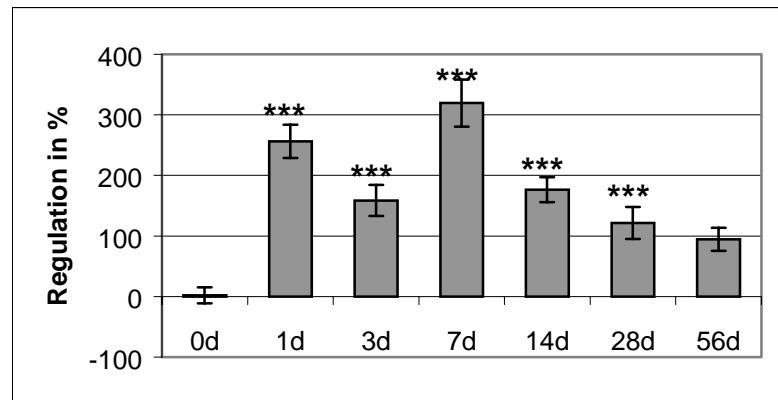
Abb. 3.11 (nächste Seite) Darstellung der mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelten Expressionsregulierung der drei Neuregulin-1 Typen im Fazialiskern nach peripherer Axotomie des Nervs. Als Referenzwert gilt der 0-Tage-Wert, der das Verhältnis der mRNA-Konzentration der beiden Fazialiskerne unoperierter Tiere darstellt (0 % Regulierung). Gegen diesen wurde auch die Signifikanz der jeweiligen Expressionsregulierung ermittelt unter Anwendung des Student's t-Tests.



A Neuregulin-1 Typ-I

Regulation in %

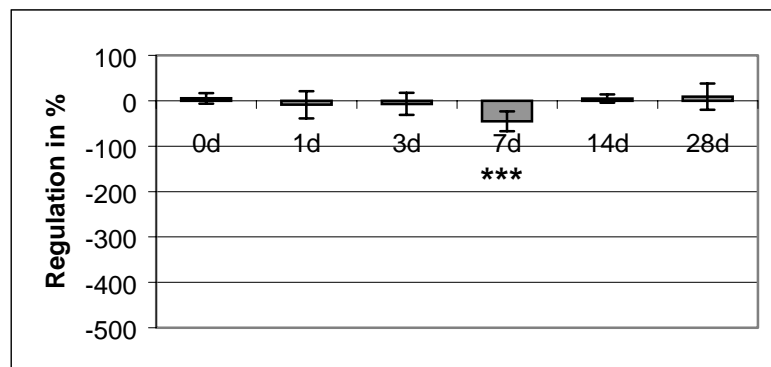
	Mittel	StAbw.
0d	2	13
1d	256	28
3d	159	26
7d	319	39
14d	176	21
28d	122	27
56d	94	19



B Neuregulin-1 Typ-II

Regulation in %

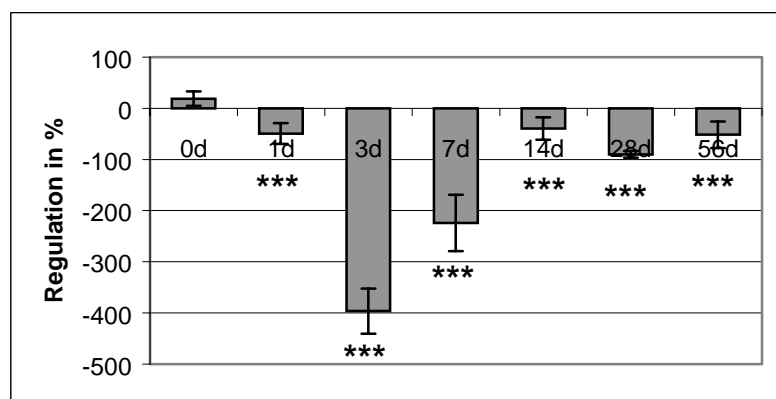
	Mittel	StAbw.
0d	5	12
1d	-9	30
3d	-7	24
7d	-45	22
14d	5	9
28d	9	29



C Neuregulin-1 Typ-III

Regulation in %

	Mittel	StAbw.
0d	19	14
1d	-49	20
3d	-396	44
7d	-224	55
14d	-40	22
28d	-90	7
56d	-51	26





Um zu untersuchen, ob bestimmte α -, oder β -Isoformen den hoch- bzw. herunterregulierten Neuregulin-Typen zugeordnet werden können, wurde auch Primer gegen diese in der semiquantitativen RT-PCR eingesetzt. Keine der drei α -Varianten ($\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 5$), aber alle fünf β -Varianten konnten im Fazialiskern auf mRNA-Ebene semiquantitativ untersucht werden. Die Isoform $\beta 1$ zeigte drei Tage nach der Fazialisaxotomie eine Erniedrigung der mRNA-Expression um ca. 1/3, gefolgt von langsamem Wiederanstieg bis nach 14 Tagen der Ausgangswert wieder erreicht war (Abb. 3.12 A). Ein identischer Verlauf der Expressionsregulierung im Fazialiskern während der ersten 14 Tage nach einer peripheren Nervenläsion war für Neuregulin-1- $\beta 2$ zu beobachten, gefolgt von einer zweiten Phase der Regulierung, die zu einem Expressionsanstieg gegenüber dem Ausgangswert führte. Für diese Isoform ebenso wie für die drei restlichen β -Isoformen war der Ausgang-mRNA-Level deutlich niedriger als der von $\beta 1$. Bei der semiquantitativen Analyse der Expression dieser vier Isoformen ($\beta 2 - \beta 5$) wurde zweistufige "seminested" RT-PCR eingesetzt. Drei Tage nach Axotomie war die mRNA von Neuregulin-1- $\beta 2$ um ca. 1/3 verringert, stieg dann wieder an und zeigte 28 Tage nach Axotomie ein Maximum mit einer Expressionserhöhung um ca. 1/3. Der Ausgangswert war 56 Tage nach Axotomie wieder erreicht (Abb. 3.12 B). Neuregulin-1- $\beta 3$ dagegen veränderte sich infolge der Axotomie in seiner Expressionsrate kaum. Nur am Tag drei war ein leichtes Absinken der mRNA-Konzentration zu beobachten (Abb. 3.12 C). Wurde eine semiquantitative RT-PCR Versuchsreihe mit einem Neuregulin-1- $\beta 4$ -spezifischen Primerpaar durchgeführt, zeigte sich - ebenso wie bei der Isoform $\beta 2$ - ein biphasischer Regulierungsverlauf. Zunächst war am dritten und siebten postoperativen Tag eine Verringerung der spezifischen mRNA um ca. 1/3 zu beobachten. Dem folgte ein Expressionsanstieg mit einem maximalen mRNA-Level ca. 60 % über dem Null-Wert am 28. Tag, gefolgt von einem Absinken auf den Ausgangswert bis zum 56. Tag (Abb. 3.12 D). Die dramatischste Expressionsregulierung war jedoch bei der Isoform $\beta 5$ zu beobachten. Einen Tag nach der Verletzung noch unverändert, wies der mRNA-Level am dritten postoperativen Tag eine Verringerung auf 1/3 des Ausgangswertes auf. Ebenso schnell wie diese mRNA herunterreguliert wurde



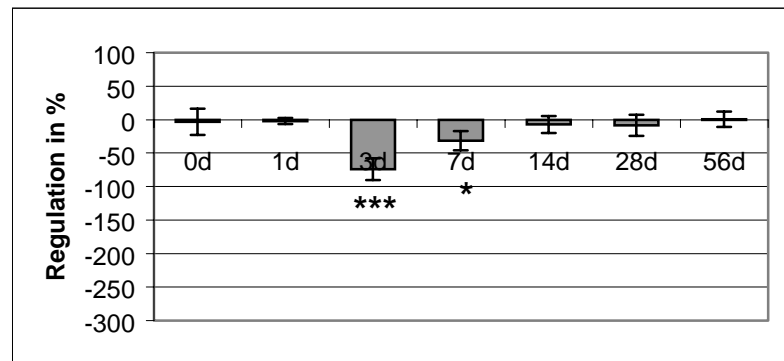
stieg sie dann auch wieder an. Bereits 14 Tage nach der Läsion war der mRNA-Ausgangswert wieder erreicht (Abb. 3.12 E).

A Neuregulin-1-β1

Regulation in %

Mittel StAbw.

0d	-3	20
1d	-2	4
3d	-74	16
7d	-31	14
14d	-7	13
28d	-8	16
56d	1	11

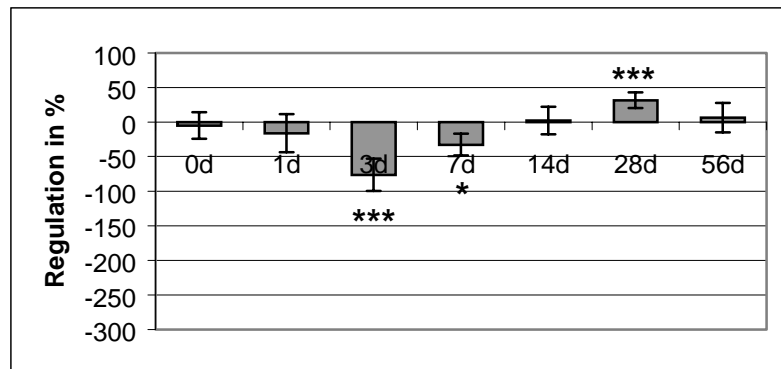


B Neuregulin-1-β2

Regulation in %

Mittel StAbw.

0d	-5	19
1d	-16	28
3d	-76	23
7d	-33	16
14d	2	20
28d	32	11
56d	6	21

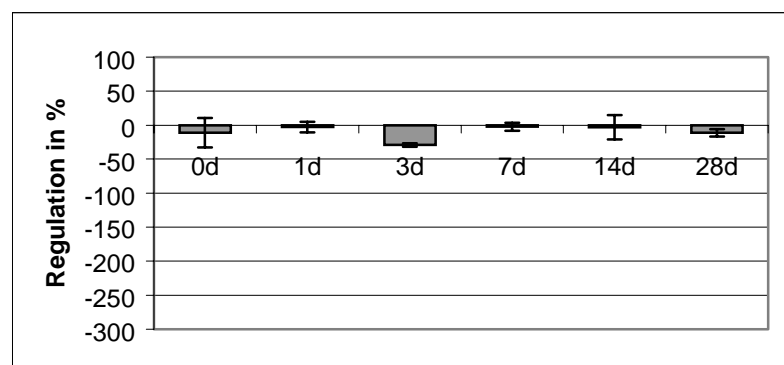


C Neuregulin-1-β3

Regulation in %

Mittel StAbw.

0d	-11	21
1d	-3	8
3d	-29	3
7d	-2	6
14d	-3	18
28d	-11	5

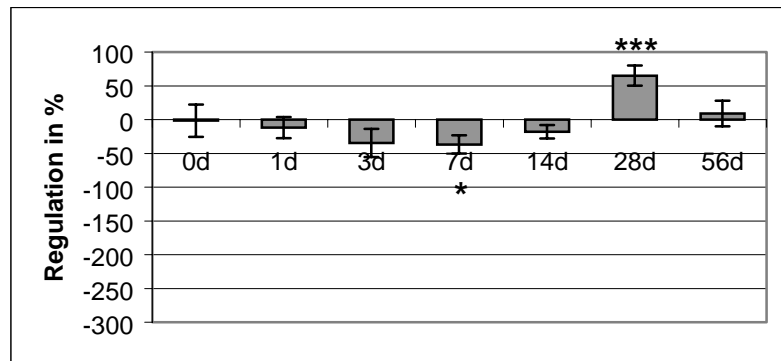




D Neuregulin-1-β4

Regulation in %

	Mittel	StAbw.
0d	-2	24
1d	-12	15
3d	-34	21
7d	-37	14
14d	-18	10
28d	65	15
56d	9	19



E Neuregulin-1-β5

Regulation in %

	Mittel	StAbw.
0d	13	15
1d	-5	14
3d	-224	34
7d	-46	13
14d	-17	26
28d	-5	13
56d	3	37

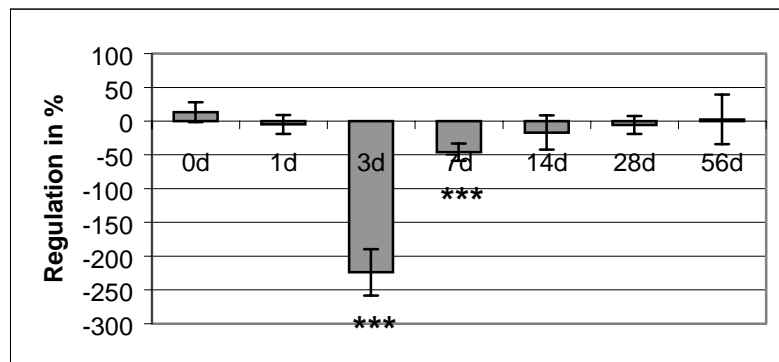


Abb. 2.12 Graphische Darstellung der Expressionsveränderungen der verschiedenen Neuregulin-1 β -Isoformen im Fazialiskern nach peripherer Läsion des Fazialisnervs. Die Regulierungen sind in Prozent ausgedrückt, 0 % bedeutet gleichen mRNA-Level auf axotomierter und Kontrollseite. Signifikanzen sind mittels Student's-t-Test durch den Vergleich der Werte der einzelnen Zeitpunkte mit dem 0-Tage-Wert ermittelt worden.

3.4.3 Zelluläre Lokalisation der Neuregulin-1 Typen im Fazialiskern nach peripherer Nervenläsion mittels *In-situ*-Hybridisierung

Die zelluläre Lokalisation der veränderten Expression der drei Neuregulin-1 Typen wurde mit Hilfe von *In-situ*-Hybridisierung untersucht. Hierbei fanden die gleichen Ribonukleotidsonden Anwendung, die bereits für die Analyse der Neuregulin-1 Verteilung im adulten Gehirn verwendet wurden. Autoradiographien mit Typ-I-Sonde auf Schnitten des Hirnstamms zeigten nach Fazialisaxotomie einen deutlichen Anstieg der Zahl kleiner Zellen, die zwischen den Motoneuronen der



axotomierten Seite lokalisiert waren. Auch eine Zunahme diffusen Signals im Fazialiskern nach Axotomie des Nervs war zu beobachten, was oft auf eine Hybridisierung in kleinen Zellen hinweist. Diese Zunahme Typ-I-positiver Zellen war bereits einen Tag nach der Läsion zu sehen, nahm aber noch bis zum siebten postoperativen Tag weiter zu. Auch 28 Tage nach der peripheren Verletzung war die Zahl positiver Gliazellen noch deutlich erhöht (Abb. 3.13 A, B). Außer in den Astrozyten war ein deutliches Signal auch in den Motoneuronen beider Fazialiskerne zu sehen (Abb. 3.13 A, B).

Hybridisierung mit einer Neuregulin-1 Typ-II-spezifischen Sonde zeigte Signal in Motoneuronen beider Kerne, jedoch keine Veränderungen der Expressionsintensität infolge der peripheren Fazialisaxotomie (Abb. 3.13 C, D).

Autoradiographien nach Hybridisierung mit einer Typ-III-spezifischen Ribonukleotidsonde zeigten eine starke Abnahme der Signalintensität in den Motoneuronen der axotomierten Seite ab dem dritten postoperativen Tag (Abb. 3.13 E, F). Sieben Tage nach der Läsion unterschieden sich die Motoneurone dieser Seite kaum noch vom umgebenden Hintergrundsignal. Innerhalb der nächsten 21 Tage stieg das Signal langsam wieder an, bis am 28. postoperativen Tag kaum noch ein Unterschied der beiden Fazialiskerne zu sehen war.

Abb. 3.13 (nächste Seite) Dunkelfeld-Aufnahmen von In-situ-Hybridisierungen mit spezifischen Sonden für Neuregulin-1 Typ-I 28 Tage nach Axotomie (A, B), Typ-II 7 Tage (C, D) und Typ-III 3 Tage nach Transektion des Nervs (E, F) im Fazialiskern der axotomierten Seite (B, D, F) und der Kontrollseite (A, C, E). Typ-I ist auf beiden Seiten in Motoneuronen (breite Pfeile) zu sehen sowie in Gliazellen (schlanke Pfeile) zwischen den Neuronen, wobei auf der operierten Seite mehr Gliazellen zu erkennen sind (A, B). Typ-II ist in Motoneuronen (breite Pfeile) beider Fazialiskerne zu sehen (C, D), Typ-III ebenfalls, allerdings ist das neuronale Signal auf der axotomierten Seite kaum noch stärker als der unspezifische Hintergrund (E, F).



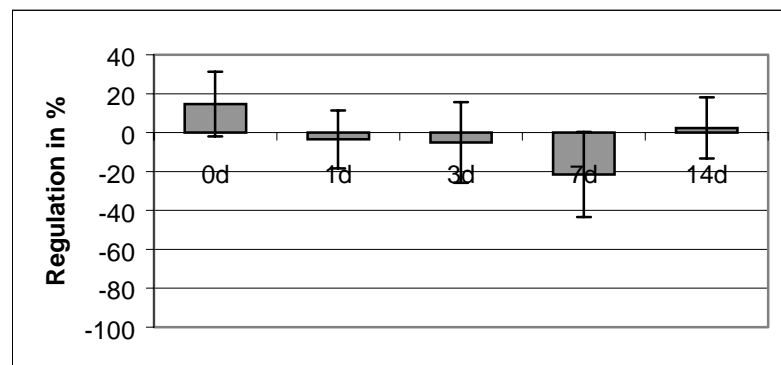
3.4.4 Semiquantitative Analyse der erbB-Rezeptor Tyrosinkinasen Expression im Fazialiskern nach peripherer Nervenläsion

Um zu untersuchen, ob außer den Regulierungsmechanismen durch die Liganden-Expression auch eine Regulierung auf Rezeptorebene stattfindet, wurde semiquantitative RT-PCR auch mit Primerpaaren durchgeführt, die gegen die Neuregulin-1 bindenden erbB-Rezeptoren gerichtet waren. Aufgrund eines sehr niedrigen Expressionsniveaus und Problemen mit der Stabilität der PCR konnte keine Quantifizierung von erbB-2 mRNA durchgeführt werden. Die Untersuchung der mRNA für erbB-3 im Fazialiskern nach einer Verletzung des Nervs zeigte keine Veränderung der Expressionsrate dieses Rezeptors (Abb. 3.14 A). Im Falle von erbB-4 dagegen konnte eine Erniedrigung des mRNA-Levels beobachtet werden. Das Minimum war sieben Tage nach Läsion mit einem um circa 1/3 verringerten mRNA-Level zu beobachten, gefolgt von einem Wiederanstieg bis zum 14. postoperativen Tag, an dem der Ausgangswert bereits wieder erreicht war (Abb. 3.14 B).

A erbB-3

Regulation in %

	Mittel	StAbw.
0d	15	17
1d	-3	15
3d	-5	21
7d	-22	22
14d	2	16





B erbB-4

Regulation in %

	Mittel	StAbw.
0d	19	12
1d	-19	19
3d	-37	21
7d	-62	27
14d	-9	13
28d	-19	6
56d	3	22

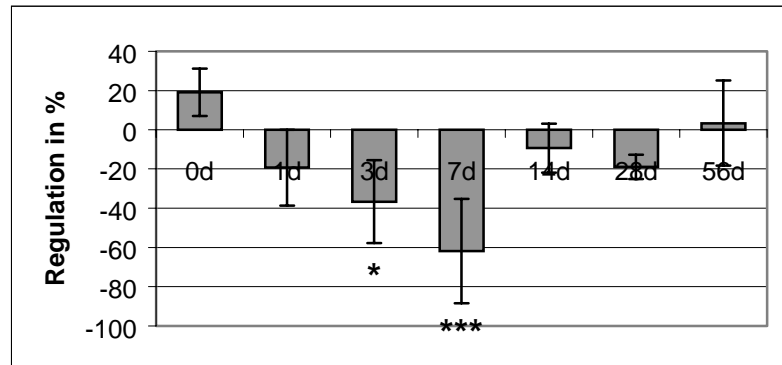


Abb. 3.14 Graphische Darstellung der Expressionsveränderungen der erbB-Rezeptor Tyrosinkinase erbB-3 und erbB-4 im Fazialiskern nach einer peripheren Läsion des Fazialisnervs in Prozent Regulierung (0 % = keine Regulierung). Während die Transkriptionsrate von erbB-3 unverändert bleibt (A), ist eine deutliche Abnahme des mRNA-Levels von erbB-4 zu beobachten. Die Signifikanz dieser Änderung wurde mittels Student's-t-Test durch den Vergleich mit den 0-Tage-Werten ermittelt.



Diskussion: Neuregulin-1 Isoformen werden hirnregions- und zellspezifisch exprimiert, während die Verteilung der erbB-Rezeptor Tyrosinkinasen ubiquitär ist

4 Diskussion

4.1 Neuregulin-1 Isoformen werden hirnregions- und zellspezifisch exprimiert, während die Verteilung der erbB-Rezeptor Tyrosinkinasen ubiquitär ist

Neuregulin-1 Typen und Spleißvarianten zeigen definierte Expressionsmuster im adulten Gehirn. Immunhistochemie mit einem pan-Neuregulin-1 Antikörper zeigte Neuronen als Hauptquelle des Proteins, aber auch eine Subpopulation positiver Astrozyten konnte in verschiedenen Hirnregionen detektiert werden.

Die weitverbreitete Expression von Neuregulin-1 in Neuronen des Kleinhirns und Vorderhirns konnte mit Hilfe von *In-situ*-Hybridisierung den Typen-I und -II zugeordnet werden, also der Gruppe von Neuregulinen, die mittels einer Ig-ähnlichen Domäne in der ECM verankert werden können. Die Expression der gleichen Neuregulin-Typen konnten im Klein- und Vorderhirn des embryonalen ZNS gefunden werden (Corfas et al., 1995), wo sie mit neuronaler Migration und Proliferation bzw. Differenzierung von Oligodendrozyten und Astrozyten im Zusammenhang stehen. Ihre Expression im adulten Gehirn legt nahe, daß sie nicht nur an der Entstehung, sondern auch an der Aufrechterhaltung glialer und neuronaler Strukturen sowie Neuron-Glia-Wechselwirkungen beteiligt sind. Außer Neuregulinen mit Ig-ähnlicher Domäne sind während der Embryonalentwicklung des Kortex, Hippocampus und Kleinhirns auch solche mit dem Typ-III N-Terminus zu beobachten (Meyer et al., 1997), die im adulten Gehirn jedoch kaum noch nachweisbar sind. Nur mit RT-PCR unter hochsensitiven Bedingungen, aber nicht mit *In-situ*-Hybridisierung, konnte Typ-III mRNA im adulten Kortex gefunden werden.

Im Gegensatz zum Klein- und Vorderhirn konnten im Hirnstamm alle drei Neuregulin-1 Typen mit Hilfe von *In-situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden. Während ein Großteil der Neurone ausschließlich Typ-I und -II Signal aufwiesen, war in einigen Kernen zusätzlichen eine starke neuronale Typ-III mRNA Expression zu beobachten. Zu diesen Kerngebieten gehört neben dem retikulären



Diskussion: Neuregulin-1 Isoformen werden hirnregions- und zellspezifisch exprimiert, während die Verteilung der erbB-Rezeptor Tyrosinkinasen ubiquitär ist

gigantozellulären Kern und dem spino-vestibulären Kern auch der Fazialiskern. In Motoneuronen des Rückenmarks und Hirnstamms, zu denen auch die Fazialis-Neurone gehören, wurden Neureguline mit einer Ig-ähnlichen Domäne bereits in der frühen Embryonalentwicklung nachgewiesen, etwas später auch die des Typs-III (Meyer et al., 1997). Beide Gruppen wirken wahrscheinlich als Proliferations- und Differenzierungssignale auf Schwann-Zellen (Übersicht in Shah et al., 1994; Morrissey et al., 1995; Adlkofer und Lai, 2000). Die zweite Neuregulin-Gruppe ist darüber hinaus entscheidend an der Bildung und Aufrechterhaltung neuromuskulärer Endplatten während der Embryonalentwicklung beteiligt (Wolpowitz et al., 2000). Die Expression von Neuregulin-1 im adulten Fazialiskern weist darauf hin, daß das Protein am Erhalt der Schwann-Scheide beteiligt sein könnte. Außerdem legt die Synthese von Neuregulin-Typ-III in adulten Motoneuronen die Vermutung nahe, daß es auch postnatal und über den Abschluß der Entwicklung des ZNS hinaus stabilisierend auf die neuromuskulären Endplatten wirkt.

Die meisten neuronalen Neureguline konnten als β -Isoformen aller drei Neuregulin-1 Typen identifiziert werden in Übereinstimmung mit der Diskussion der β -Spleißvarianten als neurale Neuregulin-Produkte (Wen et al., 1999). Im Widerspruch zu bisherigen Beobachtungen, daß α -Spleißvarianten der EGF-ähnlichen Domäne nur in mesenchymalen Neuregulin-1 Isoformen vorkommen (Meyer et al., 1997), konnten in dieser Arbeit auch drei α -Varianten ($\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 5$) mittels RT-PCR im Gehirn detektiert werden. Zwei der drei α -Isoformen konnten keinem spezifischen N-Terminus zugeordnet werden, was möglicherweise auf die Existenz mindestens eines weiteren Neuregulin-1 N-Terminus hinweist. Auch der mit einem pan- β -Primer detektierte β -Spleiß der EGF-ähnlichen Domäne in Astrozyten konnte weder einem Neuregulin-1 Typ noch einer der bekannten fünf Juxtamembran-Spleißvarianten zugeordnet werden, was auf weitere Spleißvarianten des Proteins hinweist.

Eine der α -Isoformen, $\alpha 2$, wurde außer in Neuronen auch in Astrozyten gefunden. Hier konnte sie dem Typ-I zugeordnet werden. Somit stellt Neuregulin-1 Typ-I- $\alpha 2$ die einzige identifizierte Isoform in Astrozyten dar. Ähnlich im Falle von Dystrophin, einem Protein, das die ECM mit dem Zytoskelett verbindet, konnte im



Diskussion: Neuregulin-1 Isoformen werden hirnregions- und zellspezifisch exprimiert, während die Verteilung der erbB-Rezeptor Tyrosinkinasen ubiquitär ist

Fall von Neuregulin-1 eine überwiegend mesenchymal exprimierte Spleißvariante auch in Astrozyten detektiert werden (Hager, in Vorbereitung). Es wäre interessant zu untersuchen, ob dieses Expressionsmuster noch bei anderen alternativ gespleißten Proteinen vorkommt und welche Bedeutung ihm zukommt.

Typ-III mRNA konnte unter Anwendung von RT-PCR auch in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra festgestellt werden. Hier wird Neuregulin-1 Typ-III- $\beta 1$ koexprimiert mit Typ-II- $\beta 1$ und Typ-II- $\beta 2$, jedoch mit keiner Isoform des Typs-I. Da Isoformen des Typs-III für die Etablierung und embryonale Aufrechterhaltung motorischer und sensorischer Synapsen des PNS notwendig sind (Wolpowitz et al., 2000), stellt sich die Frage, ob sie eine ähnliche Rolle auch in dopaminergen Synapsen des ZNS spielen. Das Fehlen der am weitesten verbreiteten Neuregulin-1 Typ-I Isoformen in den dopaminergen Substantia nigra Neuronen hebt diese deutlich von den Neuronen der anderen Hirnregionen ab. Ob die Expression bestimmter Neuregulin-1 Typen mit der Expression bestimmter Transmitter im Zusammenhang steht, und ob unterschiedliche „Neuregulin-Cocktails“ an der Etablierung und Stabilisierung verschiedener Synapsentypen beteiligt sind, ist eine Frage, die in der Zukunft zu lösen bleibt.

Im Gegensatz zu den differenzierten Expressionmustern dieser vielfältigen Neuregulin-1 Spleißvarianten zeigen die Neuregulin-Rezeptoren eine weitgehend ubiquitäre Expression in verschiedenen Hirnregionen und Zelltypen. Die Rezeptor Tyrosinkinasen erbB-2, erbB-3 und erbB-4 werden gleichermaßen in Motoneuronen, Substantia nigra Neuronen, Astrozyten und im Kortex exprimiert. Sowohl Neurone als auch Astrozyten könnten somit Zielzellen für Neuregulin-1 und andere EGF-ähnlichen Proteine im ZNS sein. Von allen untersuchten Zelltypen fällt nur Mikroglia aus diesem Netzwerk der Neuregulin-1-erbB-Signalübertragung heraus, da sie weder Neuregulin-1 noch ein funktionelles Rezeptor-Set exprimiert. Lediglich erbB-3, dem die Kinasen-Aktivität fehlt und das daher keine signaltransduzierenden Homodimer bilden kann (Pinkas-Kramarski et al., 1996a), konnte in diesen Zellen gefunden werden. Das ist insofern überraschend als Mikroglia ein hochproliferativer Zelltyp ist und Neuregulin-1 in die Proliferations-induktion verschiedenster Zelltypen des Nervensystems, z. B. Astrozyten und Schwannzellen, involviert ist.



Die hohe Differenzierung der Neuregulin-1 Expression verschiedener Typen und Spleißvarianten legt eine Korrelation der strukturellen Diversität mit der funktionellen Diversität des Proteins im adulten ZNS nahe. Die weit gestreute und meist gleichförmige Expression der erbB-Rezeptor Tyrosinkinasen stützt die Annahme, daß die jeweils präsentierten Neuregulin-Isoformen ausschlaggebend für die Wirkung der Neuregulin-erbB Wechselwirkung sind und nicht die exponierten Rezeptoren. Allerdings sind unter bestimmten Bedingungen, z. B. in Abhängigkeit neuronaler Aktivität (Eilam et al., 1998) und nach Verletzung des Nervensystems auch Änderungen dieser gleichförmigen erbB-Expression zu beobachten, was auf eine nicht unwichtige Rolle der Rezeptorexpression hinweist.

4.2 Neuregulin- α und - β induzieren Apoptose und Proliferation in kultivierten Astrozyten

Es konnte gezeigt werden, daß Astrozyten, die sowohl während der Entwicklung als auch im adulten Gehirn alle drei Neuregulin-1-bindenden Rezeptor Tyrosinkinasen exprimieren, *in vitro* nicht nur auf Neuregulin-1- β reagieren, wie es mehrfach beschrieben wurde, sondern auch auf die α -Variante des Proteins. Die Stimulation kultivierter Gliazellen mit Neuregulin-1 β -Isoformen, gewebeisolierten Neuregulin-Extrakten oder rekombinantem humanem GGF2 fördert die Proliferation der Zellen ebenso wie ihre Differenzierung. Auch auf Neuronen entfalten diese Neureguline *in vitro* und *in vivo* ein breites Spektrum an Aktivitäten, das von Förderung des Überlebens und der Proliferation bis zu Migration und Differenzierung reicht (Mahanthappa et al., 1994; Canoll et al., 1996). Eine Wirkung von Neuregulin-1 α -Isoformen auf Zellen des Nervensystems konnte bisher nicht gezeigt werden (Mahanthappa et al., 1994; Dong et al., 1995; Ozaki et al., 1997). Auch wurden diese Varianten bisher nur in mesenchymalen Geweben gefunden, nicht aber in neuralen (Meyer und Birchmeier, 1994; Meyer et al., 1997). Das führte zu der Annahme, Neuregulin-1 α -Isoformen seien ausschließlich mesenchymal und hätten keine Funktion im Nervensystem. In dieser Arbeit jedoch wurden komplexe Expressionsmuster verschiedener Neuregulin-1 α -Isoformen sowohl in Astrozyten als auch in Neuronen gezeigt, weshalb die Wirkung der α -Variante auf Zellen des Nervensystems untersucht wurde.



Da Astrozyten ebenso wie Neurone alle für die Neuregulin-1-Rezeption notwendigen erbB-Rezeptoren produzieren, stellen beide Zelltypen potentielle Ziele für Neuregulin- α und - β im Gehirn dar. Da jedoch Neurone die Hauptquelle von Neuregulin-1 im Gehirn sein dürften, wurden Astrozytenkulturen verwendet, um die Wirkung der beiden Neuregulin-Isoformen vergleichend zu untersuchen.

Sowohl Neuregulin- α als auch Neuregulin- β induzierte eine Erhöhung der Apoptoserate in den stimulierten Astrozytenkulturen. Bei einer längeren Kultivierung der Astrozyten in serumfreiem Medium nahm jedoch die Zahl apoptotischer Zellen auch ohne den Zusatz von Neuregulin-1 langsam zu. Nach sechs Tagen hatte die Apoptoserate der Kontrollzellen den gleichen Wert wie in den Neuregulin-stimulierten Kulturen erreicht. Die Neuregulin-1-Gabe führte aber nicht nur zu einem Absterben von Zellen, sondern bewirkte auch eine Erhöhung der Proliferationsrate. Schon nach einem Tag Stimulation mit einem der beiden Neuregulin-Peptide war eine signifikante Erhöhung der Proliferation zu beobachten. Diese verstärkte sich im Laufe der Zeit, blieb im Fall von Neuregulin- α jedoch über den gesamten beobachteten Zeitraum moderat. Bei Behandlung der Astrozyten mit Neuregulin- β dagegen war eine Erhöhung der Proliferation um mehr als das dreifache des Kontroll-Levels am sechsten Tag der Stimulation zu sehen. Eine längerfristige Gabe von Neuregulin β -Isoformen kann somit trotz der zunächst erhöhten Apoptoserate zu dem früher beobachteten Anstieg der Zellzahl führen (Pinkas-Kramarski et al., 1994). Bei Neuregulin- α dürfte diese Zunahme der Zellzahl auch bei längerer Stimulation trotz der ebenfalls erhöhten Proliferation nicht so deutlich werden, da es auch hier infolge der Apoptose zunächst zu einem massiven Absterben von Astrozyten kommt.

Beide Spleißvarianten der EGF-ähnlichen Domäne von Neuregulin-1 beeinflussen die Apoptose und Proliferation primärer Astrozyten und sind somit Kandidaten für die Regulierung astrozytärer Differenzierung im ZNS. Da Neuregulin-1 α -Isoformen nicht ausschließlich neuronaler Herkunft sind, sondern im adulten Gehirn in Form von Typ-I- α 2 auch von Astrozyten exprimiert werden, könnten in der Modulation astrozytärer Aktivität auto- oder parakrine Mechanismen zum Tragen kommen. Solche selbstregulatorischen Mechanismen mittels Neuregulin-1-erbB-



Diskussion: Bestimmte Neuregulin-1 Isoformen und erbB-Rezeptoren unterliegen einer transkriptionalen Regulierung nach einer peripheren Fazialisläsion

Interaktion wurden bereits mehrfach diskutiert, z. B. im Zusammenhang mit migrierenden kortikalen Neuronen (Anton et al., 1997) oder Schwann-Zell-Proliferation und Reifung (Übersicht in Adlkofer und Lai, 2000).

4.3 Bestimmte Neuregulin-1 Isoformen und erbB-Rezeptoren unterliegen einer transkriptionalen Regulierung nach einer peripheren Fazialisläsion

Die Beobachtung der Expression distinkter Neuregulin-1 mRNAs im Fazialiskern nach einer peripheren Fazialisläsion ermöglicht Rückschlüsse auf die Funktionen der unterschiedlichen Isoformen. Proteine, die mit der synaptischen Übertragung oder Synapsenstabilisierung im Zusammenhang stehen, werden nach einer Axotomie in ihrer Expression reduziert, während solche, die in die Reinnervation des Zielgewebes involviert sind, in ihrer Expression verstärkt werden. Immunhistochemische Markierung des Hirnstamms nach einer einseitigen Fazialisaxotomie zeigt Neuregulin-1-Immunreaktivität in Motoneuronen beider Fazialiskerne und eine Hochregulierung in GFAP-positiven Astrozyten der verletzten Seite. Diese Hochregulierung auf Proteinebene ist bereits am dritten postoperativen Tag zu beobachten. Mit Hilfe semiquantitativer RT-PCR und Neuregulin-1 Typspezifischer *In-situ*-Hybridisierung konnte die hochregulierte Isoform als Typ-I identifiziert werden. Da die Analyse der Expressionsmuster verschiedener Neuregulin-1 Isoformen Typ-I- $\alpha 2$ als einzige astrozytäre Variante zeigte, dürfte es sich auch bei dem postoperativ in Astrozyten hochregulierten Protein um Neuregulin-1 Typ-I- $\alpha 2$ handeln.

Der drastische Expressionsanstieg des Proteins erfolgt ungefähr gleich schnell wie die Verstärkung der GFAP-Synthese in denselben Zellen, und zeigt auch im weiteren einen der GFAP-Expression ähnlichen Verlauf (Tetzlaff et al., 1988). Da die GFAP-Synthese bisher als früheste gliale Antwort auf die retrograden Änderungen in axotomierten Fazialis-Motoneuronen und als möglicher Auslöser der morphologischen und funktionellen Änderungen der Astrozyten gilt (Graeber und Kreutzberg, 1988; Tetzlaff et al., 1988), könnte auch Neuregulin-1 Typ-I ein früher Modulator astrozytärer Aktivität sein.



Eine andere Gruppe von Neuregulinen, die den Typ-III N-Terminus besitzen, werden in ihrer neuronalen mRNA-Expression nach der Läsion stark reduziert. Das zu beobachtende Absinken des mRNA-Levels verläuft etwas langsamer als der für Typ-I zu beobachtende Anstieg. Drei Tage nach der Läsion ist im Fazialis-kern jedoch kaum noch mRNA für Neuregulin-1 Typ-III nachzuweisen. Dem folgt ein Expressionsanstieg bis zum 14. postoperativen Tag, an dem der Ausgangs-level fast wieder erreicht ist. Ein sehr ähnlicher Regulierungsverlauf mit einem mRNA-Minimum am Tag drei und darauffolgendem Wiederanstieg bis zum Tag 14 kann auch für einige der β -Isoformen beobachtet werden. Das legt nahe, daß diese in ihrer mRNA-Expression reduzierten Neuregulin-1 β -Isoformen ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 4$ und $\beta 5$) dem Typ-III angehören und mit der synaptischen Übertragung oder Synapsenstabilisierung im Zusammenhang stehen.

Die stärkste Reduktion des mRNA-Levels ist für die Spleißvariante- $\beta 5$ zu beobachten, der, ebenso wie der mRNA-Level des Typs-III, um mehr als 3/4 verringert wird. Somit dürfte Neuregulin-1 Typ-III- $\beta 5$ ein wichtiger Kandidat für die Stabilisierung der neuromuskulären Endplatte im adulten Organismus sein. Gestützt wird diese Annahme durch Studien an einer Knock-Out-Maus, die kein Neuregulin-1 Typ-III exprimiert, was sich besonders auf die Stabilität motorischer und sensorischer Synapsen auswirkt. Interessant zu erwähnen ist, daß der Juxtamembran-Spleiß 5 ein Stopcodon enthält und somit ein verkürztes Protein ohne Transmembrandomäne codiert, weshalb Proteine mit dieser Spleißvariante üblicherweise ECM-Proteine darstellen. Typ-III- $\beta 5$ bildet möglicherweise eine Ausnahme, da der Cystein-reiche Typ-III N-Terminus als Transmembrandomäne diskutiert wird. Neuregulin-1 Typ-III- $\beta 5$ könnte somit in der präsynaptischen Membran verankert vorliegen und durch direkten Zell-Zell-Kontakt mit der postsynaptischen Muskelzelle interagieren, wie es für Typ-III Isoformen vorgeschlagen wurde (Schroering und Carey, 1998) oder auf die Organisation der präsynaptischen Membran wirken.

Außerdem könnten diese in ihrer Expressionsrate reduzierten Neuregulin-Isoformen auch mit der Stabilisierung der Myelinscheide im adulten PNS im Zusammenhang stehen. Während der Embryonalentwicklung sind Neureguline, besonders die des Typs-III, entscheidend an der Ausbildung der Schwann-



Scheiden beteiligt, indem sie die Proliferation von Schwann-Zell-Vorläufern und später, bei submitogenen Expressionsleveln, die Differenzierung dieser Vorläufer zu reiferen, myelinisierenden Schwann-Zellen fördern (Übersicht in (Adlkofer und Lai, 2000)). Für Neuregulin-1 Type-III konnte anhand von Knockout-Studien an Embryonen gezeigt werden, daß diese Isoform weniger auf die Proliferation von Schwann-Zell-Vorläufern wirkt, als vielmehr auf das Überleben der myelinisierenden Schwann-Zellen, und somit auf die Aufrechterhaltung der entstehenden peripheren Myelin-Scheide (Wolpowitz et al., 2000). Möglicherweise wird eine ständige axonale Präsenz neuronalen Neuregulin-1 Typs-III im adulten Nerv benötigt, das als Überlebensfaktor auf die myelinisierenden Schwann-Zellen wirkt. Nach Durchtrennung des Nerts und der damit verbundenen Zerstörung der Schwann-Scheide werden andere Proliferationsfaktoren, möglicherweise ebenfalls Neureguline, die von den Schwann-Zellen selber gebildet werden, für die Neubildung des Myelins gebraucht (Carroll et al., 1997; Syroid et al., 1999). Ein wahrscheinlich wichtiger Regulator der Schwann-Zell-Proliferation im regenerierenden Nerv ist der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-1 (Insulin-like growth factor-1; IGF-1) (Syroid et al., 1999), der an der Läsionstelle vermehrt gefunden werden kann (Übersicht in (Raivich und Kreutzberg, 1993)). Möglicherweise wirken IGF-1 und Neuregulin-1, die sich gegenseitig unterstützende Effekte in der Herzkammer-Morphogenese aufweisen, auch synergistisch auf die Schwann-Zell-Proliferation an der Läsionstelle. Nach Abschluß der Proliferation und Neubildung der Schwann-Scheide würde dann Neuregulin-1 Typ-III als Myelin-Stabilisator neuronalen Ursprungs wieder gebraucht und somit erneut von den Motoneuronen exprimiert werden.

Zwei der vier Neuregulin-1 β -Isoformen, deren Expression infolge der Läsionen reduziert wurde, wiesen nicht nur eine Rückkehr des mRNA-Levels auf den Ausgangswert auf, sondern eine Erhöhung gegenüber diesem. Die mRNA-Menge von Neuregulin-1- $\beta 2$ und - $\beta 4$ waren am 28. postoperativen Tag um ca. 1/3 gegenüber ihren Ausgangswerten erhöht. Neuregulin- $\beta 2$ könnte dem Typ-I angehören, was jedoch ein Anschalten der Expression dieser Isoform infolge der Verletzung bedeuten würde, da in den oben beschriebenen Untersuchungen der Neuregulin-Expression im intakten adulten Gehirn kein Typ-I- $\beta 2$ nachgewiesen werden



konnte. Andererseits könnte es sich auch um Typ-III- $\beta 2$ handeln, das in verschiedenen Neuronen, darunter auch Motoneuronen, gefunden werden konnte. Es besteht somit die Möglichkeit, daß Neuregulin-1 Typ-III- $\beta 2$ infolge der peripheren Fazialisläsion im Fazialiskern zunächst in der Expression reduziert wird, gefolgt von einer leichten Erhöhung des Expressionslevels. 56 Tagen nach der Läsion ist der mRNA-Level von $\beta 2$ wieder auf dem Ausgangsniveau angelangt. Der erhöhte mRNA-Spiegel der Spleißvariante- $\beta 4$ kann sowohl den Typen-I als auch -III zugeordnet werden, da der $\beta 4$ -Spleiß in Kombination mit beiden N-Termini in Motoneuronen gefunden werden konnte.

Eine mögliche Aufgabe dieser biphasisch regulierten Neuregulin Isoformen steht mit der Remyelinisierung der neu ausgewachsenen Axone nach peripherer Läsion des Nervus facialis im Zusammenhang. Studien an konditionell erbB-2-defizienten Mäusen zeigten, daß die korrekte Dicke der Schwann-Scheide von der erbB-2-Signaltransduktion abhängt. Mäuse, deren myelinisierende Schwann-Zellen kein erbB-2 besitzen, bilden abnormal dünne Myelinscheiden im PNS, da sich die Schwann-Zellen in weniger Umwicklungen um die Axone legen als dies in gesunden Tieren der Fall ist (Garratt et al., 2000). Da Neuregulin-1 in der gesamten Ausbildung der Schwann-Scheiden eine entscheidende Rolle (Zorick und Lemke, 1996; Adlkofer und Lai, 2000) spielt, ist es wahrscheinlich, daß auch in diesem Zusammenhang Neuregulin-1 Isoformen als Aktivatoren der erbB-Signaltransduktion wirken, worauf auch die Studien an Neuregulin-1 Typ-III-defizienten Mäusen hinweisen (Wolpowitz et al., 2000). Die initialen Absenkung der Neuregulin-1- $\beta 2$ und - $\beta 4$ Expression im Fazialiskern nach peripherer Nervenläsion und der nachfolgende Anstieg über das Ausgangsniveau hinaus zum Zeitpunkt der beginnenden Remyelinisierung, legt die Verwicklung dieser Isoformen in die Ausbildung intakter Schwann-Scheiden nahe.

Während der Embryonalentwicklung konnte gezeigt werden, daß die Präsenz des Transkriptionsfaktors Islet-1 für die Expression von Neuregulin-1 in postmigratorischen Neuronen des ventralen Rückenmarks notwendig ist (Plaff et al., 1996; Loeb et al., 1999). In diesen Zellen gehört ein Großteil des exprimierten Neuregulin-1 Proteins dem Typ-III an, allerdings koexprimiert mit Neuregulinen, die die Ig-ähnliche Domäne besitzen. Ebenso wie Neuregulin-1 Typ-III wird Islet-1



Diskussion: Bestimmte Neuregulin-1 Isoformen und erbB-Rezeptoren unterliegen einer transkriptionalen Regulierung nach einer peripheren Fazialisläsion

in intakten Fazialis-Motoneuronen des adulten Gehirns exprimiert und infolge einer peripheren Transektion des Nerven in seiner Expressionsrate stark reduziert (Hol et al., 1999). Die Synthese dieser Neuregulin-Variante im adulten Nervensystem könnte also ebenso wie in der Embryonalentwicklung von der Expression des LIM-Typ Homeobox-Gens *Islet-1* abhängen. Anders als in der Entwicklung des Rückenmarks, werden in axotomierten Fazialisneuronen die Neuregulin-1 Typen-I und -II weiterhin exprimiert. Somit könnte *Islet-1* im adulten ZNS möglicherweise ein isoform-spezifischer Regulator der Neuregulin-Expression sein. Falls die verschiedenen Neuregulin-1 Typen durch die Aktivität unterschiedlicher Promotoren entstehen, könnte *Islet-1* einen für den Typ-III-Promotor spezifischen Transkriptionsfaktor darstellen, im Falle daß sie Produkte alternativen Spleißens sind, könnte *Islet-1* regulatorisch auf die Neuregulin-1 beeinflussenden Spleißfaktoren wirken.

Im Vergleich zu den recht großen Veränderungen der Expression verschiedener Neuregulin-1 Isoformen als Folge der Verletzung findet nur eine geringe transkriptionale Regulierung der Rezeptoren statt. Die Tyrosinkinase erbB-2 wird sowohl im intakten Fazialiskern als auch nach einer peripheren Axotomie in so geringem Ausmaß exprimiert, daß keine semiquantitative Untersuchung durchführbar war. Die Expressionsrate von erbB-3 wurde analysiert, jedoch war keine Veränderung infolge der peripheren Verletzung zu beobachten. Im Gegensatz dazu konnte ein Absinken des erbB-4 mRNA-Levels mit einem Minimum am siebten postoperativen Tag, also etwas verzögert gegenüber den reduzierten Neuregulin-1 Isoformen, beobachtet werden. Ebenso wie für die meisten Neuregulin-mRNAs war 14 Tage nach der Läsion der Ausgangswert wieder erreicht. Interessanterweise konnte für diese Rezeptor-Untereinheit eine aktivitätsabhängige Expression in hippocampalen Neuronen gezeigt werden (Eilam et al., 1998). Möglicherweise steht auch die verminderte erbB-4-Expression im Fazialiskern nach Durchtrennung des Nerven mit dem Verlust der neuronalen Aktivität im Zusammenhang.

Diese Verminderung der erbB-4 Expression zeigt, daß Neureguline oder andere EGF-ähnliche Proteine nicht nur als Faktoren an den Myelin-Scheiden oder den neuromuskulären Endplatten eine Rolle spielen, sondern auch im intakten, adulten ZNS selber wirken. Die quantitative Reduktion einer Rezeptor-Untereinheit kann



sich auf das gesamte Signaltransduktions-Netzwerk auswirken, da sie eine Verschiebung der Anzahl der einzelnen Untereinheiten zueinander bewirkt. Durch die Verminderung der zur Verfügung stehenden erbB-4 Rezeptoren steigt die relative Zahl von erbB-2 und erbB-3 an, wodurch die Bildung von erbB-2/erbB-3-Dimeren erleichtert werden könnte. Dadurch könnten Zellen, die infolge der Läsion weniger erbB-4 exprimieren, auch auf solche Neuregulin-Isoformen reagieren, auf die sie im intakten, adulten System nicht oder kaum ansprechen. Somit weist die Abnahme der Expressionsrate dieser einzelnen erbB-Rezeptor-Untereinheit auf eine nicht gering zu erachtende Rolle der Rezeptor-Präsentation in der Diversität der Neuregulin-erbB-Funktionen hin.

Die Isoform-spezifische Expression von Neuregulin-1 in verschiedenen Hirnregionen und Zelltypen des ZNS und die Isoform-spezifischen Regulierungsmuster infolge einer Verletzung sprechen dagegen wiederum für eine hochgradige Korrelation zwischen struktureller und funktioneller Diversität des Proteins. Während Neuregulin-1 Typ-I- $\alpha 2$ als einzige Variante in Astrozyten exprimiert wird und mit der Modulation astrozytärer Aktivität im Zusammenhang zu stehen scheint, dürfte Typ-III- $\beta 5$ an der Formierung und Stabilisierung neuromuskulärer Endplatten bzw. der Aufrechterhaltung der peripheren Myelinscheide im adulten Nervensystem beteiligt sein. Neuregulinen des Typs-II und der Spleißvariante- $\beta 3$ kommen dagegen Aufgaben in adulten ZNS zu, die weder durch den Verlust der synaptischen Verbindungen noch durch die Regeneration beeinflusst werden.



5 Zusammenfassung

Die Neureguline und ihre Rezeptoren, die erbB-Tyrosinkinasen, formen ein Signaltransduktionsnetzwerk, dessen Funktion entscheidend an der embryonalen und postnatalen Entwicklung von Wirbeltieren beteiligt ist. Die vier bisher bekannten Neuregulin-Gene bringen durch die Nutzung verschiedener Promotoren, alternatives Spleißen und Proteinmodifikationen wie Glykosylierung und proteolytische Spaltung eine noch unüberschaubare Vielzahl von Neuregulin-Proteinen hervor. Diese binden und aktivieren die aus den vier erbB-Rezeptor Tyrosinkinasen zusammengesetzten Homo- und Heterodimere mit unterschiedlichen Affinitäten. Störungen des Netzwerks durch Überexpression oder Ausfall einer oder mehrerer Komponenten führen zu unkontrolliertem Wachstum oder vorzeitigem Tod.

Neuregulin-1, das am längsten bekannte und am besten untersuchte Mitglied dieser Liganden-Familie, beeinflusst die Entstehung glialer Vorläuferzellen ebenso wie ihre Proliferation, Differenzierung und Reifung zu Astrozyten, Oligodendrozyten und Schwann-Zellen. Ferner fördert es die Entstehung, das Überleben und die Migration von Neuronen, die Ausbildung zentralen und peripheren Myelins, sowie die Formierung und Aufrechterhaltung peripherer sensorischer und motorischer Synapsen. Neuregulin-1 und seine Rezeptoren werden allerdings nicht nur während der Entwicklung, sondern auch im adulter Organismus exprimiert. Welche Aufgaben es dort erfüllt, ist eine größtenteils noch zu beantwortende Frage.

Daß Neuregulin-1 aufgrund alternativen Spleißens eine große Anzahl verschiedener Proteine hervorbringen kann, führt zu der Annahme, daß verschiedene Isoformen dieses Proteins verschiedene biologische Aktivitäten entfalten könnten. Ebenso könnten die unterschiedlichen Neuregulin-Wirkungen auch durch die Aktivierung unterschiedlicher erbB-Dimere in Abhängigkeit von der Rezeptor-Präsentation der Zielzelle hervorgerufen werden.

Um sich der Aufklärung des Mechanismus der funktionellen Vielfalt von Neuregulin-1-erbB Wechselwirkungen anzunähern, wurden im Rahmen der hier



vorliegenden Arbeit die Expressionsmuster verschiedener Neuregulin-1 Isoformen und erbB-Rezeptor Tyrosinkinasen im adulten Gehirn analysiert. Ferner wurden Veränderungen der Neuregulin-1-, bzw. erbB-Expression untersucht, die im Fazialiskern nach einer peripheren Axotomie des Nervus facialis zu beobachten waren. Dadurch sollte Aufschluß über die Funktionen verschiedener Neuregulin-1 Isoformen im adulten Nervensystem und während der Regeneration erhalten werden. Die Detektion von Neuregulin-1- α im adulten Gehirn führte zusätzlich zu einer Untersuchung der Wirkung dieser bisher als mesenchymal geltenden Spleißvariante auf Zellen des ZNS:

Die Untersuchungen zeigten Neurone als Hauptquelle der Neuregulin-1 Expression im Zentralnervensystem. Die meisten Neurone, allen voran cholinerge Motoneurone, zeigten eine breitgefächerte Expression verschiedener Neuregulin-1 Isoformen, die zu allen drei Neuregulin-Typen, definiert durch die jeweiligen N-Termini, gehörten. Die geringste neuronale Isoformen-Vielfalt war in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra zu beobachten, die lediglich Neuregulin-1 Typ-II- β 1, - β 2 und Typen-III- β 1 exprimierten. Das Fehlen von Neuregulin-1 Typ-I und die Expression des Typs-III heben diese Neurone stark von anderen des ZNS ab, und lassen eine Beteiligung von Neuregulin-1 an der Bildung dopaminergischer Synapsen vermuten, möglicherweise vergleichbar mit der Beteiligung an der Bildung neuromuskulärer Endplatten. In Astrozyten konnte, anders als in Neuronen, nur eine einzige Neuregulin-1 Isoform detektiert werden. Hierbei handelte es sich um Neuregulin-1 Typ-I- α 2. In Mikroglia wiederum konnte weder die Expression von Neuregulin-1 noch die eines funktionellen Rezeptor-Sets gefunden werden, weshalb Mikroglia aus dem über Neuregulin-erbB-Wechselwirkungen kommunizierenden Zellsystem ausgeschlossen werden kann. In allen anderen untersuchten Zelltypen und Hirnregionen konnte eine ubiquitäre Expression von erbB-2, erbB-3 und erbB-4 gefunden werden. Das läßt darauf schließen, daß weniger die Präsentation verschiedener Rezeptoren, als die verschiedener Liganden-Isoformen zu unterschiedlichen biologischen Aktivitäten führt.

Einige der im adulten ZNS exprimierten Neuregulin-1 Isoformen werden im Fazialiskern nach einer peripheren Nervenläsion drastisch in ihrer Expressionsrate



reduziert, was eine Beteiligung dieser Proteine unter anderem an der synaptischen Übertragung bzw. an der Synapsen-Stabilisierung nahelegt. Einen der Hauptkandidaten in diesem Zusammenhang stellt Neuregulin-1 Typ-III- β 5 dar. Neureguline des Typs-I dagegen werden in Astrozyten vermehrt exprimiert. Es dürfte sich hierbei in erster Linie um Typ-I- α 2 handeln, das möglicherweise ein Modulator astrozytärer Aktivität ist. Die ebenfalls beobachtete Verminderung der erbB-4-Expression im Fazialiskern nach peripherer Nervenläsion könnte möglicherweise auf die fehlende neuronale Aktivität zurückzuführen sein.

Die vergleichenden Untersuchungen der Wirkungen von Neuregulin-1 α - und β -Isoformen zeigen, daß beide Spleißvarianten sowohl die Apoptose als auch die Proliferation von Astrozyten stimulieren. Während α - und β -Isoformen die Apoptoserate der stimulierten Zellen ungefähr gleich stark beeinflussen, ist Neuregulin-1- β der weit potentere Proliferationsfaktor für Astrozyten. Beide Neuregulin-1 Spleißvarianten stellen mögliche Regulatoren der astrozytären Differenzierung im ZNS dar.



6 Anhang

6.1 Lösungen

Für alle Experimente und Lösungen wurde Wasser aus einer Reinstwasseranlage (USF Seral Deutschland, Ransbach-Baumbach) verwendet. Diese ist DNase- und RNase-frei und kann daher auch für RNA-Arbeit direkt verwendet werden. Lösungen, die mit RNA in Verbindung gebracht wurden, wurden nach dem Ansetzen zusätzlich autoklaviert.

6.1.1 Puffer

0,5 M EDTA, pH 8: 186,1 g EDTA-Disodiumsalz
ca. 20 g NaOH-Plätzchen (pH 8,0 einstellen)
in 800 ml H₂O lösen
auf 1 l auffüllen, autoklavieren

3 x Lämmli-Puffer: 187,5 mM Tris HCl, pH 6,8
6 % SDS
30 % Glyzerin
0,01 % Bromphenolblau
15 % β-Mercaptoethanol

Ladepuffer für Agarosegele:
0,125 g Bromphenolblau
0,125 g Xylencyanol FF
13 ml Glycerol
35 ml H₂O lösen

5 x PBS (phosphate buffer saline):
36 g NaCl
7,4 g Na₂HPO₄
2,15 g KH₂PO₄
in 1 l H₂O lösen; autoklavieren

PBS/BSA/Natriumazid: 0,01M PBS (pH 7,4)
0,1% BSA;
0,05% NaN₃



Proteinase-Puffer:	50 mM Tris HCl, pH 7 5 mM EDTA pH 8,0 in H ₂ O
RNAse-Puffer:	0,5 M NaCl 10 mM Tris HCl pH 7,0 1 mM EDTA pH 8,0 in H ₂ O
SDS-Elektrophoresepuffer für Westerngele:	250 mM Glycin 25 mM Tris HCl, pH 8,0 0,1 % SDS
STET:	8 % Sucrose 0,1 % Triton-X100 50 mM EDTA 50 mM Tris HCl pH 8,0 in H ₂ O
20 x SSC (standard sodiumcitrat):	175,3 g NaCl 88,2 g Sodiumcitrat in 800 ml H ₂ O lösen pH auf 7,0 einstellen auf 1 l auffüllen
10 x TAE:	48,4 g Tris HCl, pH 7,0 11,42 ml Eisessig 40 ml EDTA (0,25 M) mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
10 x TBE:	109 g Tris 55 g Borsäure 40 ml EDTA, 0,5 M, pH 8 mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
10 x TBST:	10 mM Tris HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,05 % Tween-20
TE (Tris-EDTA):	10 mM Tris HCl pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0 in H ₂ O



Tris HCl (1 M):	121,1 g Tris in 800 ml H ₂ O lösen pH mit konz. HCl einstellen, auf 1 l auffüllen
Transblot-SD-Puffer:	2,9 g Glycin 5,8 g Trisbase 0,73 g SDS 200 ml Methanol mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
Tritonlysispuffer:	50 mM Hepes, pH 7.5 150 mM NaCl 1.5 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA (Boehringer, Mannheim) 10 % Glyzerin 1 % Triton X-100 Lösung bei 4 °C lagern direkt vor Anwendung zugeben: 2 mM Na ₃ VO ₄ 10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Leupeptin 1 mM PMSF
Verdünnungspuffer für Taq-Polymerase:	20 mM Tris (pH 8) 100 mM KCl 0,1 mM EDTA 1 mM DTT 87 % Glycerol 0,5 % NP40 0,5 % Tween-20 in H ₂ O lösen; bei -20 °C lagern

6.1.2 Medien

Astrozytenmedium:	DMEM (Gibco Life Technologies, Rockville, USA) 100 U/ml Streptomycin/Penicillin (Gibco) 15 % fötales Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin)
LLB-Medium:	10 g Trypton oder Pepton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 200 µl 5 M NaOH



LLB-Agar:	15 g LLB-Agar mit LLB-Medium auf 1 l auffüllen, autoklavieren
Saline I:	8,1 g NaCl 0,402 g KCl 0,156 g Na ₂ HPO ₄ 0,15 g KH ₂ PO ₄ 4 g Dextrose auf 1 l H ₂ O, pH auf 7,2 einstellen steril filtrieren
serumfreies Astrozytenmedium:	500 ml DMEM (Gibco) 500 µl Penicillin/Streptavidin (Gibco) 100 µl Transferin/Insulin (je 100 mg in 4 ml PBS; Sigma, Deisenhofen) 6,5 µl Progesteron (1 mg/ml Ethanol; Sigma) 1 µl Na ₂ SeO (30 mM)
SOC-Medium:	2 % Bactotrypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM MgSO ₄ 0,036 % Glucose
Lösung 1:	120 mM NaCl, 5 mM KCl 1,2 mM KH ₂ PO ₄ 25 mM NaHCO ₃ 13 mM Glucose 1,2 mM MgSO ₄ 10 mg/ml phenol red 3 mg/ml BSA
Substantia-nigra-Medium:	BME (Basal Medium, Eagles; Gibco) 10 % FCS (Biochrom, Berlin) 2 mM L-Glutamin (Gibco Life Technologies) 50 U/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco) 6,25 µg/ml Dextrose



6.1.3 Farblösungen

Coomassie-Brilliantblau: Lösung A: 90 % Methanol
0,3 % Coomassie-Brilliantblau R250
in H₂O

Lösung B: 1 % Kupfer(II)sulfat*5 H₂O
20 % Essigsäure

Lösungen A und B vor Gebrauch 1:1 mischen

Coomassie-Entfärber: 10 % Essigsäure
25 % Methanol
0.5 % Kupfer(II)sulfat*5 H₂O
in H₂O

Hämalaun: 1 g Hämatoxylin
0,2 g Natriumjodat (NaJO₃)
50 g Kalialaun KAl(SO₄)₂ x 12 H₂O
unter schütteln in 800 ml H₂O lösen
50 g Chloralhydrat (Cl₃CCH(OH)₂)
1g krist. Zitronensäure
auf 1 l auffüllen, gut verschlossen im Dunkeln lagern
und vor Gebrauch filtrieren

Ponceau-S-Lösung: 0,5 % Ponceau-S
1 % Essigsäure
in H₂O

6.1.4 Sonstiges

10 % APS: 10 g Ammoniumpersulfat
100 ml H₂O

5 M Ammoniumacetat: 385 g Ammoniumacetat
in 800 ml H₂O lösen
auf 1 l mit auffüllen, filtrieren

Acrylamidgele, 8%ig (10 Minigele für PCR-Elektrophorese):
75,5 ml H₂O
32 ml 30 % Acrylamid
12 ml 10 x TBE
240 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)
240 µl 10% APS
1 Stunde polymerisieren lassen



Chromgelatine:	1,0 g Gelatine 0,1 g Kaliumchrom III sulfat in erwärmtem Wasser unter Rühren lösen abkühlen lassen und vor Gebrauch filtrieren
30 % Chloralhydrat:	30 g Chloralhydrat in 100 ml H ₂ O lösen; lichtgeschützt lagern
Denhardt's Reagenz:	5 g Ficoll (Typ 400, Pharmacia) 5 g Polyvinylpyrrolidone (Sigma) 5 g BSA (Sigma) in 500 ml H ₂ O lösen; bei -20 °C lagern
Fixierer F24:	240 g Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃ * 5 H ₂ O) 10 g Natriumsulfit (Na ₂ SO ₃) wasserfrei 25 g Natriumdisulfit (Na ₂ S ₂ O ₅) wasserfrei 500 ml Wasser 50°C mit kaltem Wasser auf 1 l auffüllen
Hybridisierungsmix:	50 % Formamide 20 mM TrisHCl, pH 7,0 5 mM EDTA, pH 8,0 10 mM PBS 10 % Dextransulfat 1x Denhardt's Reagenz 0,2 % N-Laurylsarcosine 0,5 mg/ml tRNA
Natriumacetat, 3 M:	24,7 g Natriumacetat in 100 ml H ₂ O lösen pH 5,2 mit Essigsäure einstellen
10 % SDS:	100 g Sodiumdodecylsulfat in 1 l H ₂ O leicht erwärmen und unter Rühren lösen
Westergele (für 5 Minigele):	
Trenngel, 15 %	30 ml Polyacrylamid, 30 % 22,5 ml Tris HCl, pH 8,8 6,5 ml H ₂ O 600 µl SDS, 10 % 600 µl APS, 10 % 30 µl TEMED



Sammelgel, 3 % 4 ml Polyacrylamid, 30 %
 5 ml Tris HCl, pH 6,8
 29,7 ml H₂O
 800 µl SDS, 10 %
 800 µl APS, 10 %
 60 µl TEMED

6.2 FACS-Analysen Neuregulin-stimulierter Astrozyten

6.2.1 Ausgangsdaten zur Apoptose-Bestimmung

Alle Werte geben die Rate apoptotischer Zellen in Prozent der insgesamt gezählten Zellzahl an.

6h	Kontr.	alpha	beta **	24 h	Kontr.	alpha ***	beta ***
	17.39	13.82	13.92		14.69	17.48	16.89
	11.83	10.45	16.46		15.53	17.95	12.88
	14.66	16.77	15.65		12.06	15.94	15.66
	14.04	14.33	15.77		12.15	14.16	12.66
	10.59	16.22	23.36		12.30	20.28	21.13
	11.11	13.91	20.18		10.48	17.98	19.27
	16.05	15.48	28.64		13.87	18.39	21.29
	11.35	17.80	27.58		11.42	17.01	18.65
					15.08	15.73	
						20.01	
Mittel	13.38	14.85	20.20	Mittel	13.06	17.49	17.30
StAbw	2.53	2.27	5.73	StAbw	1.78	1.89	3.39
StA %	18.90	15.31	28.36	StA %	13.59	10.82	19.57
P		0.24	0.01	P		0.00	0.00

3d	Kontr.	alpha	beta*	6d	Kontr.	alpha	beta
	28.56	27.72	34.17		23.17	30.49	25.98
	30.12	23.67	30.77		26.88	30.38	17.59
	31.45	23.19	28.61		29.35	28.04	24.25
	30.06	28.01	28.07		33.41	25.41	48.07
	34.29	33.36	28.61		27.45	27.84	35.24
	22.38	30.99	36.36		35.02	45.49	30.62
	21.07	35.08	32.20		27.28	27.24	25.50
	25.86	30.46	34.07		30.22	31.68	22.31
			36.91		34.17	32.10	20.34
			36.55		31.78		



Mittel	27.97	29.06	32.63	Mittel	29.87	30.96	27.77
StAbw	4.55	4.26	3.48	StAbw	3.77	5.88	9.25
StA %	16.26	14.65	10.65	StA %	12.63	18.99	33.33
P		0.63	0.03	P		0.63	0.52

6.2.2 Ausgangsdaten zur Proliferations-Bestimmung

Für jede Bestimmung ist der radioaktive Einbau in cpm angegeben, die Anzahl lebender Zellen und die sich aus diesen Angaben ergebende Berechnung des radioaktiven Einbaus pro Zelle.

1 Tag Stimulation

cpm			Zellzahl			cpm/Zelle		
Kontr.	alpha	beta	Kontr.	alpha ***	beta ***	Kontr.	alpha	beta
1498	1064	1448	9814	4540	6769	0.153	0.234	0.214
1525	1183	1523	11074	6122	7273	0.138	0.193	0.209
1543	1202	1599	11238	7217	8069	0.137	0.167	0.198
1554	1334	1614	11274	7634	8532	0.138	0.175	0.189
1617	1558	1683	11830	7783	9005	0.137	0.200	0.187
1644	1589	1720	12763	7838	9951	0.129	0.203	0.173
1690	1647	1754	13045	7928	10098	0.130	0.208	0.174
1798	1749	1832	13057	8871	10550	0.138	0.197	0.174

3 Tage Stimulation

cpm			Zellzahl			cpm/Zelle		
Kontr.	alpha	beta	Kontr.	alpha *	beta ***	Kontr.	alpha	beta
395	416	401	3547	3218	3009	0.111	0.129	0.133
420	424	505	4146	3382	3039	0.101	0.125	0.166
489	481	551	4491	3441	3219	0.109	0.140	0.171
642	482	597	5037	3863	3754	0.127	0.125	0.159
711	523	599	6020	4382	3831	0.118	0.119	0.156
746	525	632	6276	4415	3854	0.119	0.119	0.164
847	542	651	7218	5138	4014	0.117	0.105	0.162
850	588	657	7279	5139	4209	0.117	0.114	0.156

6 Tage Stimualtion

cpm			Zellzahl			cpm/Zelle		
Kontr.	alpha	beta	Kontr.	alpha	beta	Kontr.	alpha	beta
1250	717	1047	4349	1662	1133	0.287	0.432	0.924
1279	806	1161	4649	1872	1284	0.275	0.431	0.816



1394	835	1174	5600	1948	1391	0.249	0.429	0.835
1403	872	1277	6033	2116	1416	0.233	0.412	0.829
1411	893	1436	6415	2367	1485	0.220	0.377	0.860
1573	910	1459	7562	3858	1976	0.208	0.236	0.727
1623	1020	1487	8566	4370	2162	0.189	0.233	0.675
2091	1025	1703	8589	4396	3117	0.243	0.233	0.477

6.3 Regulierung von Neuregulin-1 Isoformen und erbB-Rezeptor Tyrosinkinasen im Fazialiskern nach peripher Nervenläsion

Regulierung von Nrg-1 Typ-I mRNA nach Fazialisaxotomie

Tier	op/co	Mittelwert	StAbw.	StAbw. %	P(T<=t)
0A	0,896	1,020	0,137	13,444	
0B	1,092				
0C	0,978				
0D	1,048				
0E	1,239				
0F	0,868				
1A2	2,715	3,564	0,983	27,573	9,1E-05
1D2	4,652				
1E2	2,602				
1R/W	3,208				
1S/T	3,298				
1S	4,906				
3BC	3,322	2,586	0,661	25,562	0,0002
3T	2,124				
3W	2,369				
3S	3,106				
3U	2,987				
3V	1,610				
7A2	4,093	4,194	1,624	38,716	0,00076
7E2	5,873				
7EII	3,634				
7V	6,338				
7AII/FII	3,087				
7T	2,140				
14S	2,534	2,764	0,575	20,814	2,9E-05
14T	2,464				
14U	3,726				
14V	3,129				
14W	2,622				
14A2	2,106				



28A3	1,423	2,215	0,588	26,553	0,00078
28D3	2,843				
28G2	2,266				
28-5	2,329				
28F2	2,111				
28C3	1,533				
56D	1,996	1,944	0,371	19,106	0,00025
56E	1,837				
56-2	2,416				
56-6	1,524				
56-4/5	2,138				
56-3	1,506				
56-3	1,506				

Regulierung von Nrg-1 Typ-II mRNA nach Fazialisaxotomie

Tier	op/co	Mittelwert	StAbw.	StAbw. %	P(T<=t)
0A	1,137	1,053	0,122	11,596	
0B	0,983				
0C	0,935				
0D	1,138				
0E	1,205				
0Fn	0,918				
1A2	1,179	0,920	0,276	30,019	0,3089
1S/T	1,321				
1D2	0,663				
1U	0,706				
1B2	0,714				
1E2	0,939				
3S	0,873	0,934	0,228	24,406	0,28656
3T	0,717				
3V	0,818				
3R	1,337				
3W	0,800				
3U	1,058				
7CII	0,752	0,688	0,152	22,055	0,00101
7EII	0,427				
7E2	0,592				
7S	0,841				
7T	0,749				
7A2	0,769				
14R	1,156	1,050	0,096	9,139	0,96268
14S	0,910				
14T	1,088				



Anhang

14U	1,079				
14W	0,954				
14A2	1,110				
28C2	0,725	1,090	0,312	28,623	0,79134
28-5	1,505				
28F2	0,737				
28G2	1,119				
28C3	1,322				
28E3	1,130				

Regulierung von Nrg-1 Typ-III mRNA nach Fazialisaxotomie

Tier	op/co	Mittelwert	StAbw.	StAbw. %	P(T<=t)
0A	1,264	1,188	0,167	14,021	
0B	1,192				
0C	0,959				
0D	1,094				
0E	1,455				
0F	1,166				
1A2	0,768	0,670	0,137	20,494	0,00016
1D2	0,553				
1E2	0,505				
1V	0,669				
1U	0,650				
1C2	0,878				
3W	0,329	0,201	0,089	44,038	1,6E-07
3U	0,178				
3S	0,261				
3T	0,227				
3V	0,124				
3E2	0,090				
7EII	0,146	0,308	0,170	55,040	3,9E-06
7E2	0,167				
7AII/FII	0,289				
7T	0,536				
7U	0,499				
7CII	0,212				
14R	0,673	0,717	0,157	21,875	0,0005
14S	0,547				
14T	0,528				
14V	0,850				
14W	0,817				
14U	0,886				
28-5	0,475	0,527	0,035	6,593	2,5E-06



28G2	0,525				
28-5	0,574				
28G2	0,505				
28A3	0,528				
28B3	0,552				
56B	0,616	0,661	0,172	25,976	0,0003
56-5	0,725				
56-6	0,707				
56A	0,398				
56D	0,599				
56-4/5	0,918				

Regulierung der Nrg-1- β 1 mRNA nach Fazialisaxotomie

Tier	ko/op	Mittelwert	StAbw.	StAbw. %	P(T<=t)
0C	0,983	0,968	0,189	19,560	
0F	0,906				
0E	1,184				
0A	1,149				
0B	0,661				
0D	0,927				
1V	0,953	0,979	0,044	4,494	0,890
1R/W	0,979				
1T/S	0,985				
1S/T	1,062				
1R/W	0,960				
1A2	0,938				
3R	0,608	0,574	0,093	16,146	0,001
3X	0,740				
3H	0,474				
3U	0,518				
3S	0,546				
3T	0,556				
7S	0,822	0,761	0,110	14,421	0,021
7V	0,780				
7T	0,620				
7U	0,800				
7W	0,903				
7R	0,640				
14H	1,066	0,934	0,119	12,778	0,713
14S	1,082				
14V	0,909				
14W	0,872				
14T	0,901				



Anhang

14U	0,772				
28-5	0,985	0,922	0,145	15,741	0,648
28E2	0,906				
28F2	1,029				
28G2	0,798				
28A3	0,716				
28C3	1,101				
56-6	0,917	1,008	0,115	11,427	0,672
56-4/5	0,827				
56B	1,117				
56D	1,093				
56E	1,005				
56-2	1,087				

Regulierung der Nrg-1- β 2 mRNA nach Fazialisaxotomie

Tier	ko/op	Mittelwert	StAbw.	StAbw. %	P(T<=t)
0B	0,897	0,954	0,182	19,073	
0C	0,971				
0D	0,857				
0E	1,104				
0F	0,693				
0A	1,202				
1V	0,752	0,862	0,239	27,787	0,469
1T/S	0,889				
1U	1,182				
1A2	0,665				
1E2	1,097				
1D2	0,583				
3R	0,627	0,567	0,132	23,241	0,002
3S	0,427				
3V	0,410				
3T	0,529				
3W	0,716				
3X	0,691				
7R	0,889	0,754	0,121	15,988	0,049
7S	0,752				
7CII	0,644				
7U	0,656				
7W	0,671				
7A2	0,915				
14R	1,263	1,023	0,204	19,933	0,551
14S	0,875				



14T	0,908				
14U	0,861				
14V	1,304				
14W	0,925				
28G2	1,150	1,317	0,149	11,298	0,004
28-5	1,128				
28B2	1,312				
28C2	1,400				
28E2	1,484				
28F2	1,428				
56A	0,679	1,065	0,227	21,303	0,372
56E	1,253				
56-2	1,018				
56-4/5	1,294				
56-6	0,978				
56C	1,166				

Regulierung der Nrg-1- β 3 mRNA nach Fazialisaxotomie

Tier	ko/op	Mittelwert	StAbw.	StAbw. %	P(T<=t)
0A	1,170298	0,901331	0,193279	21,44369	
0B	0,684862				
0C	0,975641				
0D	0,71051				
0E	1,04196				
0F	0,824716				
1U	0,903142	0,975483	0,076007	7,79173	0,553038
1V	1,05469				
1Wco/Rop	0,968616				
3S	0,791614	0,775165	0,019604	2,529012	0,311786
3U	0,780408				
3A2	0,753472				
7S	1,018184	0,978978	0,058712	5,997317	0,530267
7W	1,007274				
7R	0,911476				
14S	1,091023	0,971133	0,171717	17,68207	0,61458
14R	1,047961				
14V	0,774417				
28F2	0,919728	0,888994	0,046643	5,246745	0,918874
28A3	0,911931				
28B3	0,835324				



Regulierung der Nrg-1- β 4 mRNA nach Fazialisaxotomie

Tier	ko/op	Mittelwert	StAbw.	StAbw. %	P(T<=t)
0A	1,346404	0,983931	0,234138	23,79621	
0B	0,708324				
0C	1,066274				
0D	0,78409				
0E	1,098171				
0F	0,900324				
1U	1,12201	0,894319	0,138396	15,47506	0,438408
1V	0,83013				
1U	0,993568				
1V	0,739475				
1E2	0,831556				
1R/W	0,849173				
3V	0,854081	0,743584	0,155527	20,91579	0,062657
3R	0,830398				
3S	0,637837				
3U	0,556874				
3W	0,950259				
3X	0,632057				
7R	0,818109	0,730736	0,099448	13,60927	0,034966
7U	0,626277				
7S	0,873582				
7V	0,678874				
7T	0,643395				
7CII	0,744181				
14R	0,808082	0,847283	0,0826	9,748813	0,207357
14S	0,809003				
14T	0,828766				
14W	0,856967				
14U	1,006523				
14V	0,774359				
28G2	1,514421	1,650955	0,247826	15,01108	0,000732
28-5	1,86563				
28B2	1,226395				
28C2	1,680015				
28E2	1,735784				
28F2	1,883485				
56C	1,121592	1,089166	0,205462	18,86412	0,427254
56D	1,030928				
56E	1,006535				
56-2	1,080533				
56-4/5	0,837163				



56-6 1,458248

Regulierung der Nrg-1- β 5 mRNA nach Fazialisaxotomie

Tier	ko/op	Mittelwert	StAbw.	StAbw. %	P(T<=t)
0C	0,835078	1,061789	0,190477	17,93927	
0E	0,989777				
0F	1,000128				
0A	1,17588				
0B	1,382008				
0D	0,987863				
1U	0,831897	0,954221	0,132029	13,83634	0,282093
1V	0,89768				
1R/W	1,013876				
1T/S	0,824664				
1S/T	0,984497				
1A2	1,172711				
3S	0,273175	0,308767	0,106089	34,35886	7,19E-06
3U	0,264526				
3V	0,257244				
3R	0,204293				
3T	0,503079				
3D2	0,350284				
7W	0,574957	0,684142	0,089103	13,02405	0,001337
7R	0,698141				
7S	0,710499				
7V	0,719502				
7U	0,588907				
7T	0,812845				
14S	0,707827	0,854582	0,219343	25,66669	0,111195
14R	0,737292				
14V	0,915084				
14U	1,000971				
14W	1,18194				
14T	0,584379				
28B3	0,873458	0,948526	0,126619	13,349	0,253012
28C3	1,027164				
28E3	0,925415				
28C2	0,775366				
28F2	0,946752				
28G2	1,143001				
56E	0,555659	1,025385	0,376173	36,68605	0,836759
56-3	0,922467				
56-4/5	0,748276				



56-6	0,997355
56B	1,546346
56-2	1,382206

Regulierung von erbB-3 mRNA nach Fazialisaxotomie

Tier	Reg.	Mittelwe rt	StAbw.	StAbw. %	P(T<=t)
0A	1,205	1,146	0,191	16,624	
0B	0,877				
0C	1,071				
0D	1,461				
0E	1,135				
0F	1,129				
1U	0,817	0,966	0,144	14,896	0,197
1V	1,104				
1So/Tc	0,979				
3R	1,180	0,952	0,198	20,756	0,197
3W	0,841				
3S	0,835				
7E2	0,820	0,891	0,062	6,928	0,064
7U	0,922				
7S	0,931				
14S	0,960	1,024	0,161	15,728	0,375
14T	1,207				
14R	0,904				

Regulierung von erbB-4 mRNA nach Fazialisaxotomie

Tier	Reg.	Mittelwe rt	StAbw.	StAbw. %	P(T<=t)
0B	1,197	1,191	0,144	12,061	0,163
0C	1,040				
0D	1,375				
0F	1,118				
0A	1,350				
0E	1,065				
1R/W	0,944	0,838	0,162	19,379	0,115
1A2	0,863				
1V	1,040				
1S/T	0,884				
1D2	0,703				
1E2	0,595				



3T	0,471	0,732	0,155	21,150	0,022
3W	0,832				
3S	0,724				
3U	0,930				
3V	0,686				
3X	0,747				
7EII	0,446	0,618	0,164	26,536	0,004
7T	0,496				
7E2	0,552				
7S	0,821				
7AII/FII	0,569				
7U	0,823				
14R	0,946	0,914	0,115	12,533	0,273
14T	1,069				
14U	1,005				
14V	0,845				
14W	0,861				
14S	0,758				
28-5	0,839	0,841	0,052	6,196	0,068
28F2	0,914				
28G2	0,813				
28A3	0,782				
28B3	0,805				
28C3	0,892				
56-5	1,022	1,034	0,226	21,817	
56A	0,823				
56B	0,966				
56C	1,339				
56D	0,790				
56E	1,264				



7 Referenzliste

- Adlkofer, K. and C. Lai. 2000. Role of neuregulins in glial cell development. *GLIA* 29:104-111.
- Alroy, I. and Y. Yarden. 1997. The erbb signaling network in embryogenesis and oncogenesis - signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS. Letters.* 410:83-86.
- Anton, E.S., M.A. Marchionni, K.F. Lee, and P. Rakic. 1997. Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development* 124:3501-3510.
- Aubert, I., J.L. Ridet, and F.H. Gage. 1995. Regeneration in the adult mammalian CNS: guided by development. *Current opinion in Neurobiology* 5:625-635.
- Ben-Baruch, N. and Y. Yarden. 1994. Neu Differentiation Factors: A Family of Alternatively Spliced Neuronal and mesenchymal Factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine* 206:221-227.
- Benfey, M. and A.J. Aguayo. 1982. Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nerve grafts. *Nature* 296:150-152.
- Bermingham-McDonogh, O., K.L. McCabe, and T.A. Reh. 1996. Effects of GGF/neuregulins on neuronal survival and neurite outgrowth correlate with erbB2/neu expression in developing rat retina. *Development* 122:1427-1438.
- Blinzinger, K. and G.W. Kreutzberg. 1968. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie* 85:145-157.



- Brockes, J.P., K.J. Fryxell, and G.E. Lemke. 1981. Studies on cultured Schwann cells: the induction of myelin synthesis, and the control of their proliferation by a new growth factor. *Journal of Experimental Biology* 95:215-230.
- Burden, S. and Y. Yarden. 1997. Neuregulins and their receptors: A versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 18:847-855.
- Busfield, S.J., D.A. Michnick, T.W. Chickering, T.L. Revett, J. Ma, E.A. Woolf, C.A. Comrack, B.J. Dussault, J. Woolf, A.J. Goodearl, and D.P. Gearing. 1997. Characterization of a neuregulin-related gene, Don-1, that is highly expressed in restricted regions of the cerebellum and hippocampus. *Molecular & Cellular Biology* 17:4007-4014.
- Cammermeyer, J. 1965. Juxtavascular karyokinesis and microglia cell proliferation during retrograde reaction in the mouse facial nucleus. *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 38:1-22.
- Cannella, B., C.J. Hoban, Y.L. Gao, R. Garcia-Arenas, D. Lawson, M. Marchionni, D. Gwynne, and C.S. Raine. 1998. The neuregulin, glial growth factor 2, diminishes autoimmune demyelination and enhances remyelination in a chronic relapsing model for multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:10100-10105.
- Canoll, P.D., J.M. Musacchio, R. Hardy, R. Reynolds, M.A. Marchionni, and J.L. Salzer. 1996. Ggf/neuregulin is a neuronal signal that promotes the proliferation and survival and inhibits the differentiation of oligodendrocyte progenitors. *Neuron*. 17:229-243.
- Carraway, K., III and S.J. Burden. 1994. Neuregulins and their receptors. *Current Opinion. in. Neurobiology*. 5(5). 1995.:606-612.



- Carraway, K., III, J.L. Weber, M.J. Unger, J. Ledesma, N. Yu, M. Gassmann, and C. Lai. 1997. Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* 1997:512-516.
- Carroll, S.L., M.L. Miller, P.W. Frohnert, S.S. Kim, and J.A. Corbett. 1997. Expression of neuregulins and their putative receptors, erbb2 and erbb3, is induced during wallerian degeneration. *Journal. of. Neuroscience.* 17:1642-1659.
- Chang, H., D.I. Riese, W. Gilbert, D.F. Stern, and U.J. McMahan. 1997. Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* 387:509-512.
- Corfas, G., K.M. Rosen, H. Aratake, R. Krauss, and G.D. Fischbach. 1995. Differential expression of aria isoforms in the rat brain. *Neuron* 14:103-115.
- Dong, Z., A. Brennan, N. Liu, Y. Yarden, G. Lefkowitz, R. Mirsky, and K.R. Jessen. 1995. Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron.* 15:585-596.
- Eilam, R., R. Pinkaskramarski, B.J. Ratzkin, M. Segal, and Y. Yarden. 1998. Activity-dependent regulation of neu differentiation factor neuregulin expression in rat brain. *Proceedings. of. the. National. Academy. of. Sciences. of. the. United. States. of. America.* 95:1888-1893.
- Falls, D.L., K.M. Rosen, G. Corfas, W.S. Lane, and G.D. Fischbach. 1993. ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* 72:801-815.
- Fischbach, G.D. and K.M. Rosen. 1997. Aria - a neuromuscular junction neuregulin. *Annual Review of Neuroscience* 20:429-458.



- Friede, R.L. and M.A. Johnstone. 1967. Responses of thymidine labeling of nuclei in gray matter and nerve following sciatic transection. *Acta Neuropathologica* 7:218-231.
- Garratt, A.N., O. Voiculescu, P. Topilko, P. Charnay, and C. Birchmeier. 2000. A dual role of erbB2 in myelination and in expansion of the Schwann cell precursor pool. *Journal of Cell Biology* 148:1035-1046.
- Gassmann, M. and G. Lemke. 1997. Neuregulins and neuregulin receptors in neural development. *Current opinion in Neurobiology* 7:87-92.
- Graeber, M.B. and G.W. Kreutzberg. 1988. Delayed astrocyte reaction following facial nerve axotomy. *Journal of Neurocytology* 17:209-220.
- Graeber, M.B. and G.W. Kreutzberg. 1990. Astrocytic Reactions accompanying motor neuron regeneration. *Advances in Neural Regeneration Research* :215-224.
- Graeber, M.B., W. Tetzlaff, W.J. Streit, and G.W. Kreutzberg. 1988. Microglial cells but not astrocytes undergo mitosis following rat facial nerve axotomy. *Neuroscience Letters* 85:317-321.
- Guy, P.M., J.V. Platko, L.C. Cantley, R.A. Cerione, and K.L. Carraway. 1994. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:8132-8136.
- Hager, G., E. Eckert, and F.W. Schwaiger. 1999. Semiquantitative analysis of low levels of mRNA expression from small amounts of brain tissue by nonradioactive reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Neuroscience Methods* 89:141-149.
- Hanahan, D. 1997. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277:48-50.



- Harari, D., E. Tzahar, J. Romano, M. Shelly, J.H. Pierce, G.C. Andrews, and Y. Yarden. 1999. Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 18:2681-2689.
- Harris, D.A., D.L. Falls, R.M. Dill-Devor, and G.D. Fischbach. 1988. Acetylcholine receptor-inducing factor from chicken brain increases the level of mRNA encoding the receptor alpha subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:1983-1987.
- Ho, W.H., M.P. Armanini, A. Nuijens, H.S. Phillips, and P.L. Osheroff. 1995. Sensory and motor neuron-derived factor. A novel heregulin variant highly expressed in sensory and motor neurons. *Journal of Biological Chemistry* 270:14523-14532.
- Hol, E.M., F.W. Schwaiger, A. Werner, A. Schmitt, G. Raivich, and G.W. Kreutzberg. 1999. Regulation of the LIM-type homeobox gene islet-1 during neuronal regeneration. *Neuroscience* 88:917-925.
- Holmes, W.E., M.X. Sliwkowski, R.W. Akita, W.J. Henzel, J. Lee, J.W. Park, D. Yansura, N. Abadi, H. Raab, G.D. Lewis, and a. et. 1992. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* 256:1205-1210.
- Horan, T., J. Wen, T. Arakawa, N. Liu, D. Brankow, S. Hu, B. Ratzkin, Philo, and JS. 1995. Binding of Neu differentiation factor with the extracellular domain of Her2 and Her3. *Journal of Biological Chemistry* 270:24604-24608.
- Jones, J.T., R.W. Akita, and M.X. Sliwkowski. 1999. Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Letters* 447:227-231.
- Karunagaran, D., E. Tzahar, R.R. Beerli, X.M. Chen, D. Grausporta, B.J. Ratzkin, R. Seger, N.E. Hynes, and Y. Yarden. 1996. Erbb-2 is a common auxiliary subunit of ndf and egf receptors - implications for breast cancer. *EMBO Journal*. 15:254-264.



- Kim, D.G., S.S. Chi, K.H. Lee, S.Y. Rhee, Y.H. Kwon, C.H. Chung, H.M. Kwon, and M.S. Kang. 1999. Neuregulin stimulates myogenic differentiation in an autocrine manner. *Journal of Biological Chemistry* 274:15395-15400.
- Kramer, R., N. Bucay, D.J. Kane, L.E. Martin, J.E. Tarpley, and L.E. Theill. 1996. Neuregulins with an ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development. *Proceedings. of. the. National. Academy. of. Sciences. of. the. United. States. of. America.* 93:4833-4838.
- Kreutzberg, G.W. 1966. Autoradiographische Untersuchung über die Beteiligung von Gliazellen an der axonalen Reaktion im Facialiskern der Ratte. *Acta Neuropathologica* 7:149-161.
- Kreutzberg, G.W. 1993. Dynamic changes in motoneurons during regeneration. *Restorative Neurology and Neuroscience*
- Kreutzberg, G.W., M.B. Graeber, and W.J. Streit. 1989. Neuron-glia relationship during regeneration of motoneurons. *Metabolic Brain Disease* 4:81-85.
- Kreutzberg, G.W., W. Tetzlaff, and L. Toth. 1984. Cytochemical changes of Cholinesterases in Motoneurons during Regeneration. 273-288.
- Lemke, G. 1996. Neuregulins in development. *Molecular & Cellular Neuroscience* 7:247-262.
- Liu, X.F., H. Hwang, L.G. Cao, M. Buckland, A. Cunningham, J. Chen, K.R. Chien, R.M. Graham, and M.D. Zhou. 1998a. Domain-specific gene disruption reveals critical regulation of neuregulin signaling by its cytoplasmic tail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:13024-13029.
- Liu, X.F., H. Hwang, L.G. Cao, D.Z. Wen, N.L. Liu, R.M. Graham, and M.D. Zhou. 1998b. Release of the neuregulin functional polypeptide requires its cytoplasmic tail. *Journal of Biological Chemistry* 273:34335-34340.



- Loeb, J.A. and G.D. Fischbach. 1995. Aria can be released from extracellular matrix through cleavage of a heparin-binding domain. *Journal of Cell Biology* 130:127-135.
- Loeb, J.A. and G.D. Fischbach. 1997. Neurotrophic factors increase neuregulin expression in embryonic ventral spinal cord neurons. *Journal of Neuroscience* 17:1416-1424.
- Loeb, J.A., T.S. Khurana, J.T. Robbins, A.G. Yee, and G.D. Fischbach. 1999. Expression patterns of transmembrane and released forms of neuregulin during spinal cord and neuromuscular synapse development. *Development* 126:781-791.
- Mahanthappa, N.K., E.S. Anton, and W.D. Matthew. 1994. Glial growth factor 2, a soluble neuregulin, directly increases Schwann cell motility and indirectly promotes neurite outgrowth. *Journal. of. Neuroscience.* 16:4673-4683.
- Marchionni, M.A., A.D.J. Goodearl, M.S. Chen, O. Bermingham Mcdonogh, C. Kirk, M. Hendricks, F. Danehy, D. Misumi, J. Sudhalter, and Et A. 1993. Glial growth factors are alternatively spliced erbb2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* 362:312-318.
- Meyer, D., T. Yamaai, A. Garratt, E. Riethmacher-Sonnenberg, D. Kane, L.E. Theill, and C. Birchmeier. 1997. Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development* 124:3575-3586.
- Meyer, D. and C. Birchmeier. 1994. Distinct isoforms of neuregulin are expressed in mesenchymal and neuronal cells during mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:1064-1068.



- Morrissey, T.K., N. Kleitman, and R.P. Bunge. 1995. Human schwann cells in vitro .2. Myelination of sensory axons following extensive purification and heregulin-induced expansion. *Journal of Neurobiology* 28:190-201.
- Moscoso, L.M., G.C. Chu, M. Gautam, P.G. Noakes, J.P. Merlie, and J.R. Sanes. 1995. Synapse-associated expression of an acetylcholine receptor-inducing protein, ARIA/hergulin, and its putative receptors, ErbB2 and ErbB3, in developing mammalian muscle. *Developmental Biology* 172:158-169.
- Ozaki, M., M. Sasner, R. Yano, H.S. Lu, and A. Buonanno. 1997. Neuregulin-beta induces expression of an NMDA-receptor subunit. *Nature*. 390:691-694.
- Peles, E. and Y. Yarden. 1993. Neu and its ligands: From an oncogene to neural factors. *Bioessays* 15:815-824.
- Pinkas-Kramarski, R., R. Eilam, O. Spiegler, S. Lavi, N. Liu, D. Chang, D. Wen, M. Schwartz, and Y. Yarden. 1994. Brain neurons and glial cells express Neu differentiation factor- heregulin: A survival factor for astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:9387-9391.
- Pinkas-Kramarski, R., M. Shelly, S. Glathe, B.J. Ratzkin, and Y. Yarden. 1996a. Neu differentiation factor neuregulin isoforms activate distinct receptor combinations. *Journal. of. Biological. Chemistry*. 271:19029-19032.
- Pinkas-Kramarski, R., M. Shelly, B.C. Guarino, L.M. Wang, L. Lyass, I. Alroy, M. Alimandi, A. Kuo, J.D. Moyer, S. Lavi, M. Eisenstein, B.J. Ratzkin, R. Seger, S.S. Bacus, J.H. Pierce, G.C. Andrews, and Y. Yarden. 1998. Erbb tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network. *Molecular & Cellular Biology* 18:7602.
- Pinkas-Kramarski, R., L. Soussan, H. Waterman, G. Levkowitz, I. Alroy, L. Klapper, S. Lavi, R. Seger, B.J. Ratzkin, M. Sela, and Y. Yarden. 1996b.



- Diversification of neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO. Journal.* 15:2452-2467.
- Plaff, S.L., M. Mendelsohn, C.L. Stewart, T. Edlund, and T.M. Jessell. 1996. Requirement for LIM homeobox gene Isl1 in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* 84:309-320.
- Raivich, G. and G.W. Kreutzberg. 1993. Peripheral Nerve Regeneration: Role of Growth Factors and their Receptors. *Int. J. Devl. Neuroscience* 11:311-324.
- Richardson, P.M., U.M. Guinness, and A.J. Aguayo. 1980. Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature* 284:264-265.
- Rimer, M., I. Cohen, T. Lomo, S.J. Burden, and U.J. McMahan. 1998. Neuregulins and erbb receptors at neuromuscular junctions and at agrin-induced postsynaptic-like apparatus in skeletal muscle. *Molecular & Cellular Neuroscience* 12:1-15.
- Rio, C., H.I. Rieff, P. Qi, and G. Corfas. 1997. Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron* 19:39-50.
- Sandrock, A.W., A.J. Goodearl, Q.W. Yin, D. Chang, and G.D. Fischbach. 1995. Aria is concentrated in nerve terminals at neuromuscular junctions and at other synapses. *Journal of Neuroscience* 15:6124-6136.
- Schroering, A. and D.J. Carey. 1998. Sensory and motor neuron-derived factor is a transmembrane heregulin that is expressed on the plasma membrane with the active domain exposed to the extracellular environment. *Journal of Biological Chemistry* 273:30643-30650.
- Schwaiger, F.W., G. Hager, G. Raivich, and G.W. Kreutzberg. 1998. Cellular activation in neuroregeneration. *Progress in Brain Research* 117:197-210.



- Shah, N.M., M.A. Marchionni, I. Isaacs, P. Stroobant, and D.J. Anderson. 1994. Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. *Cell* 77:349-360.
- Shelly, M., R. Pinkaskramarski, B.C. Guarino, H. Waterman, L.M. Wang, L. Lyass, M. Alimandi, A. Kuo, S.S. Bacus, J.H. Pierce, G.C. Andrews, and Y. Yarden. 1998. Epiregulin is a potent pan-erbB ligand that preferentially activates heterodimeric receptor complexes. *Journal. of. Biological. Chemistry.* 273:10496-10505.
- Shinoda, J., J. Nakao, Y. Iizuka, Y. Toba, T. Yazaki, T. Kawase, and K. Uyemura. 1997. Multiple isoforms of neuregulin are expressed in developing rat dorsal root ganglia. *Journal. of. Neuroscience. Research.* 50:673-683.
- Syroid, D.E., T.S. Zorick, C. Arbet-Engels, T.J. Kilpatrick, W. Eckhart, and G. Lemke. 1999. A role for insulin-like growth factor-I in the regulation of Schwann cell survival. *Journal of Neuroscience* 19:2059-2068.
- Tetzlaff, W., M.B. Graeber, M.A. Bisby, and G.W. Kreutzberg. 1988. Increased glial fibrillary acidic protein synthesis in astrocytes during retrograde reaction of the rat facial nucleus. *GLIA* 1:90-95.
- Tetzlaff, W., M.B. Graeber, and G.W. Kreutzberg. 1986. Reaction on Motoneurons and Their Microenvironment to Axotomy. *Experimehntal Brain Research* Suppl. 13:3-8.
- Tzahar, E., R. Pinkaskramarski, J.D. Moyer, L.N. Kapper, I. Alroy, G. Levkowitz, M. Shelly, S. Henis, M. Eisenstein, B.J. Ratzkin, M. Sela, G.C. Andrews, and Y. Yarden. 1997. Bivalence of egf-like ligands drives the erbB signaling network. *EMBO. Journal.* 16:4938-4950.
- Vartanian, T., G. Fischbach, and R. Miller. 1999. Failure of spinal cord oligodendrocyte development in mice lacking neuregulin. *Proceedings of*

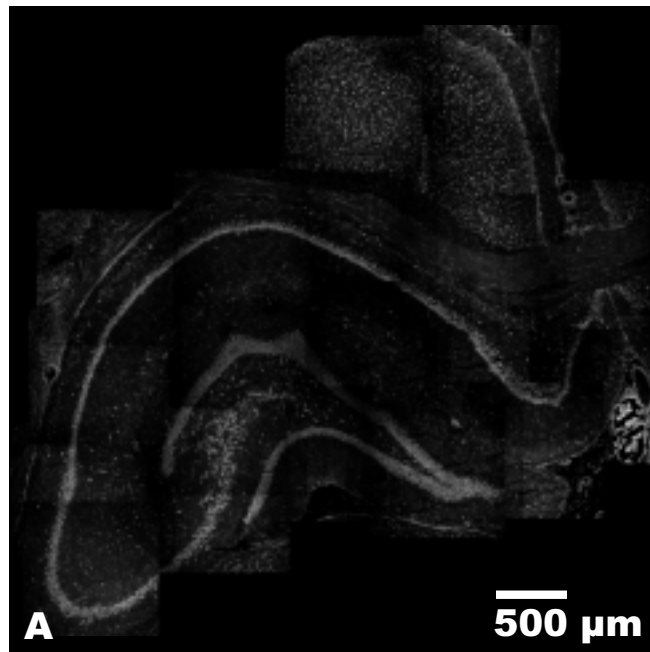


the National Academy of Sciences of the United States of America 96:731-735.

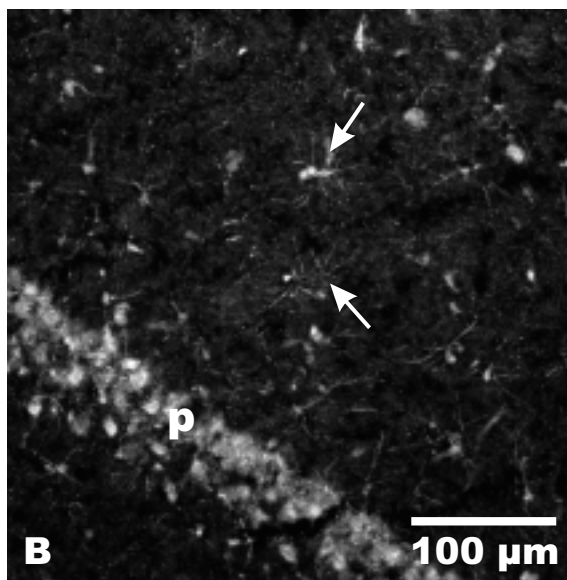
- Vartanian, T., A. Goodearl, A. Viehover, and G. Fischbach. 1997. Axonal neuregulin signals cells of the oligodendrocyte lineage through activation of her4 and schwann cells through her2 and her3. *Journal of Cell Biology* 137:211-220.
- Wen, D., E. Peles, R. Cupples, S. Suggs, V. S.S. Bacus, Y. Luo, G. Trail, S. Hu, S.M. Silbiger, and Et Al. 1992. Neu differentiation factor a transmembrane glycoprotein containing an egf domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* 69 (3) 1992. 559-572.
- Wen, D., S. Suggs, V. D. Karunagaran, N. Liu, R.L. Cupples, Y. Luo, A.M. Janssen, N. Ben-Baruch, D.B. Trollinger, and Et Al. 1999. Structural and functional aspects of the multiplicity of neu differentiation factors. *Molecular & Cellular Biology* 14:1909-1919.
- Wolpowitz, D., T.A. Mason, P. Dietrich, M. Mendelsohn, D.A. Talmage, and L.W. Role. 2000. Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* 25:79-91.
- Zhang, D., M.X. Sliwkowski, M. Mark, G. Frantz, R. Akita, Y. Sun, K. Hillan, C. Crowley, J. Brush, and P.J. Godowski. 1997. Neuregulin-3 (NRG3): A novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:9562-9567.
- Zhao, J.J. and G. Lemke. 1998. Selective disruption of neuregulin-1 function in vertebrate embryos using ribozyme-trna transgenes. *Development* 125:1899-1907.



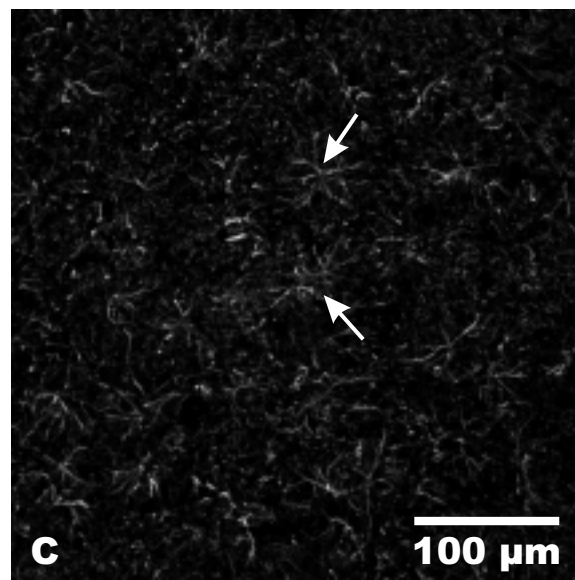
Zorick, T.S. and G. Lemke. 1996. SCHWANN CELL DIFFERENTIATION. *Current Opinion in Cell Biology* 8:870-876.



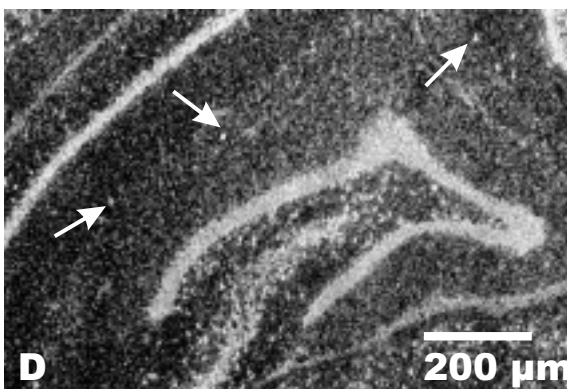
A
pan-Neuregulin-1



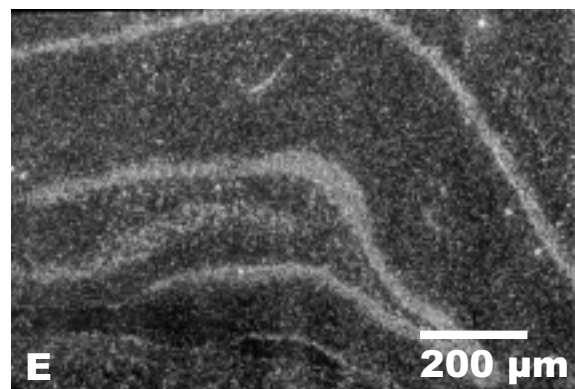
B
pan-Neuregulin-1



C
GFAP

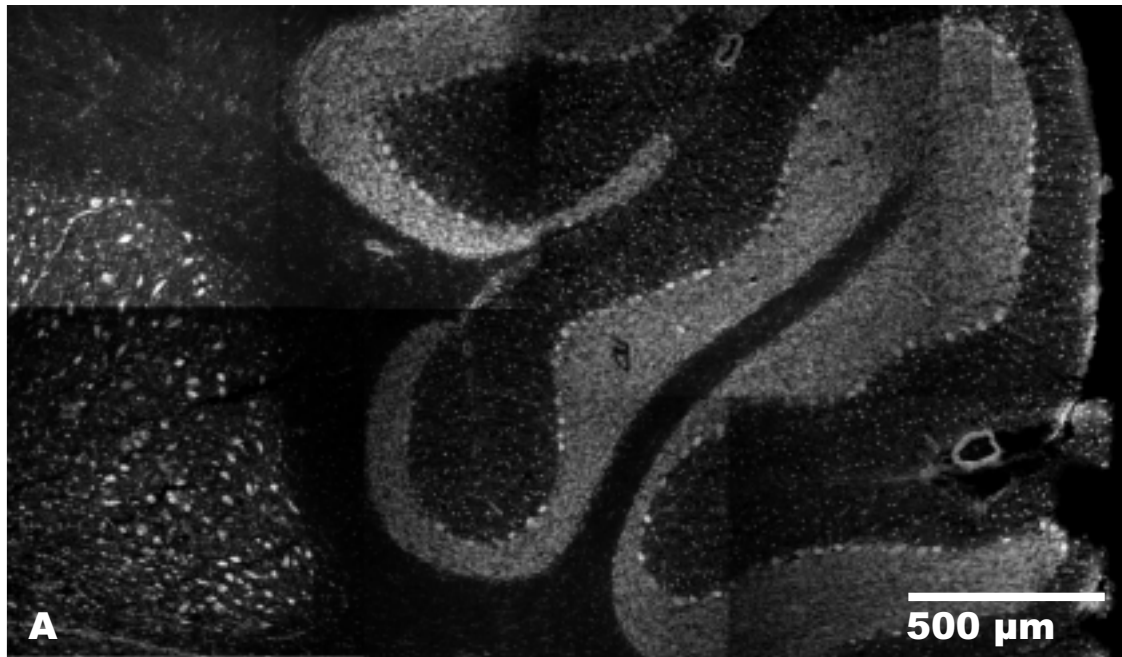


D
Nrg-1 Typ-I

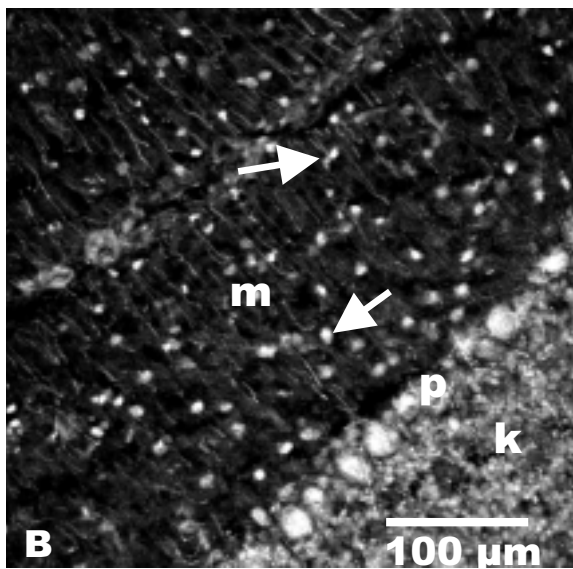


E
Nrg-1 Typ-II

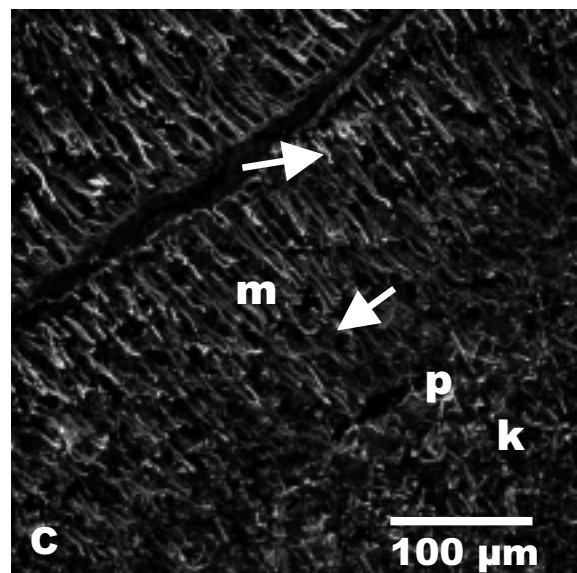
Abb. 3.1



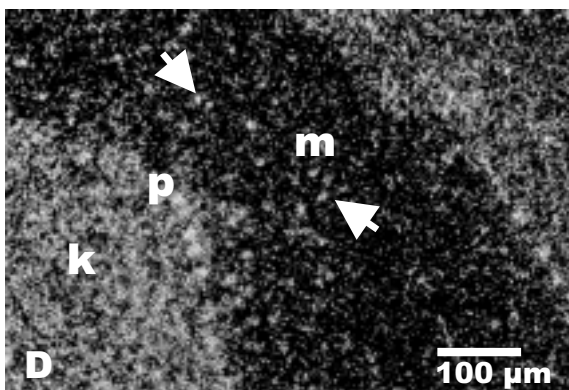
A
pan-Neuregulin-1



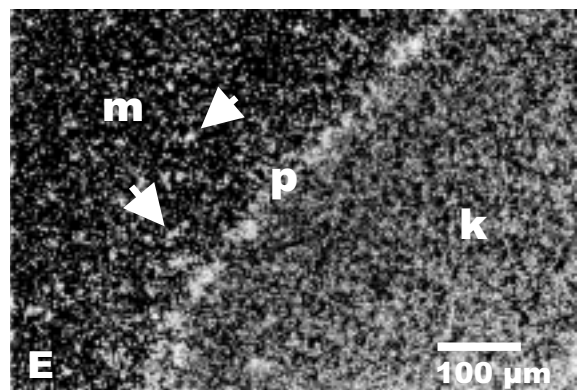
B
pan-Neuregulin-1



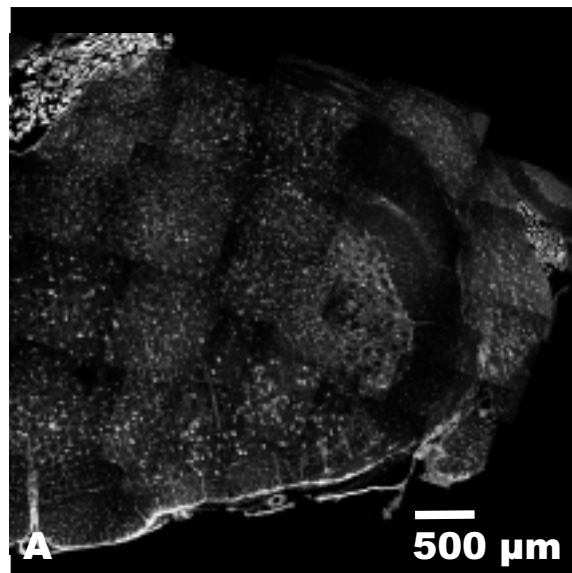
C
GFAP



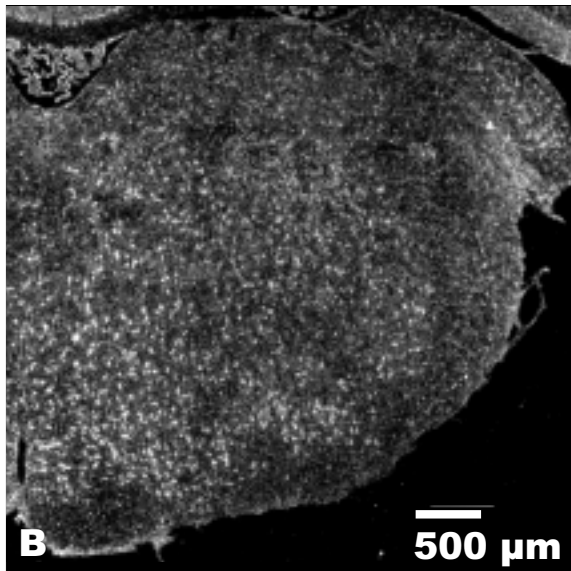
D
Nrg-1 Typ-I



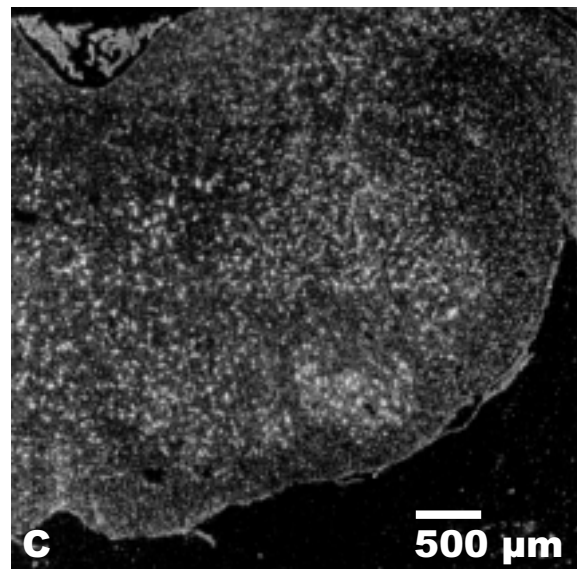
E
Nrg-1 Typ-II



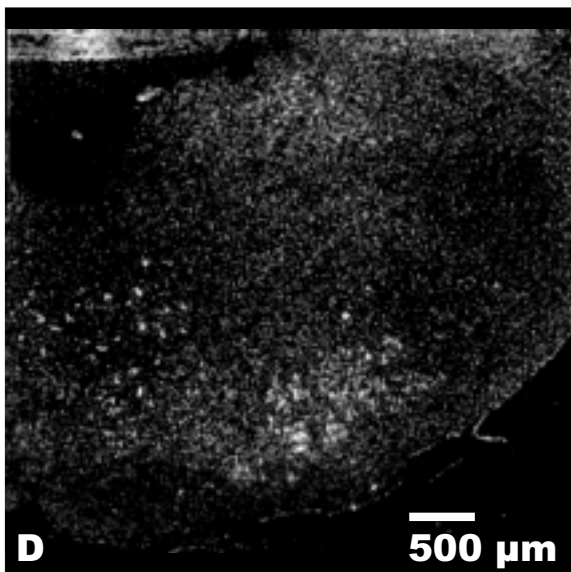
A
pan-Neuregulin-1



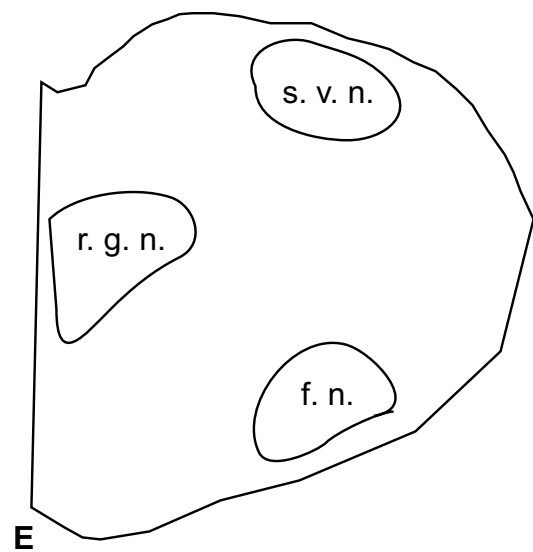
B
Typ-I



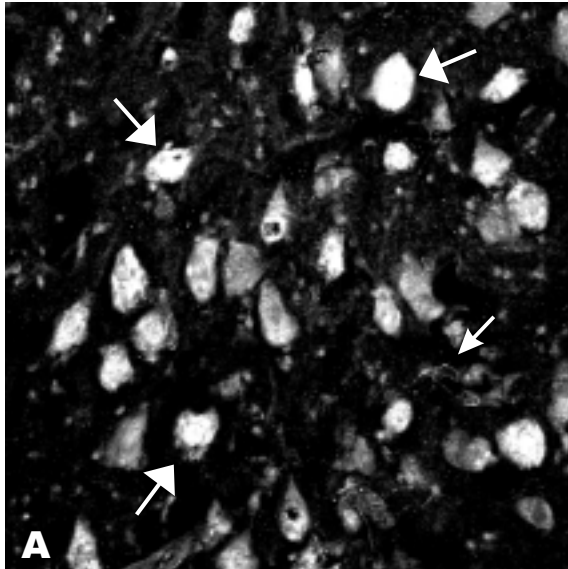
C
Typ-II



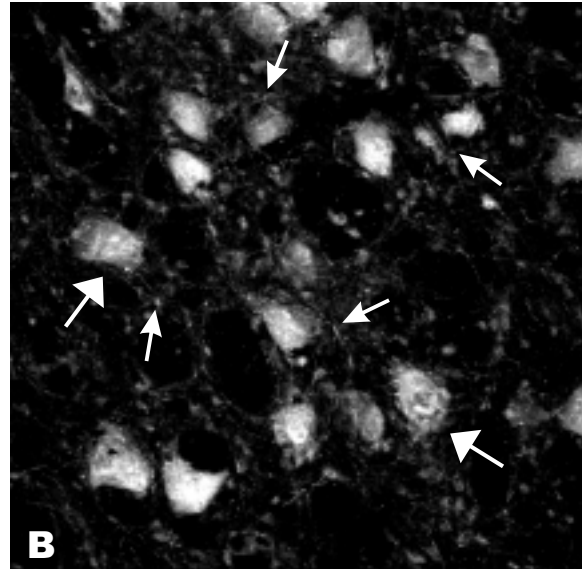
D
Typ-III



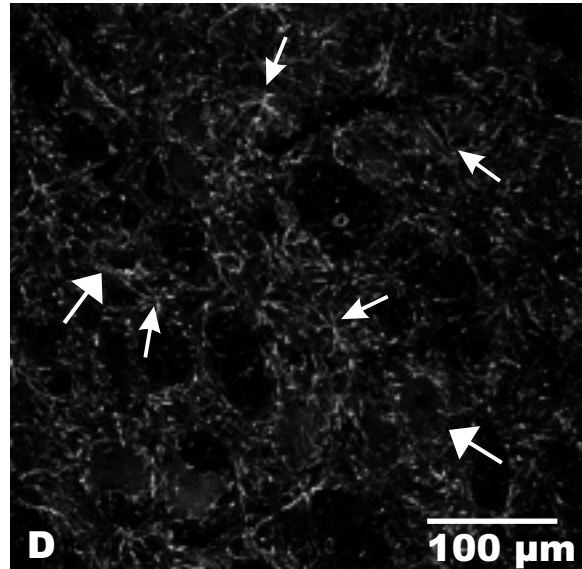
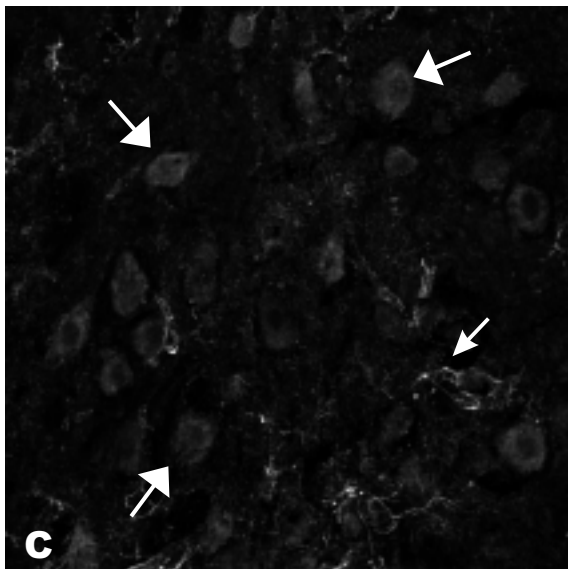
Kontrolle



Axotomie



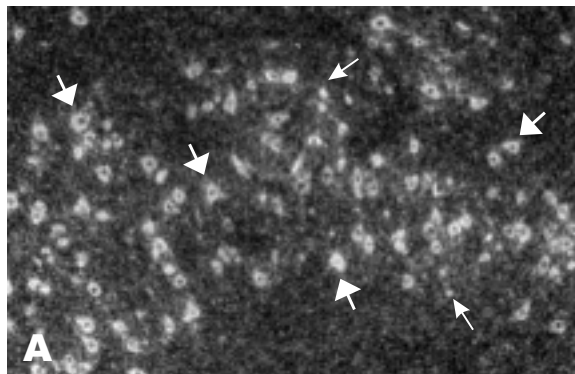
Neuregulin-1



GFAP

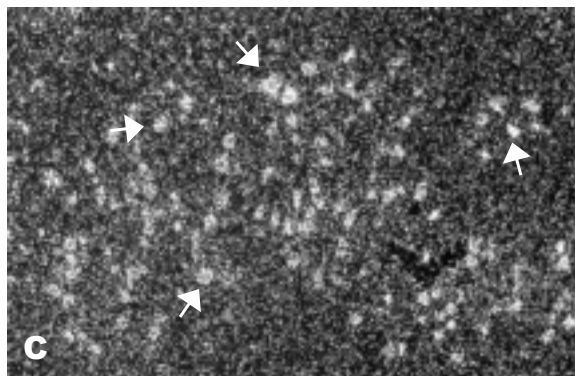
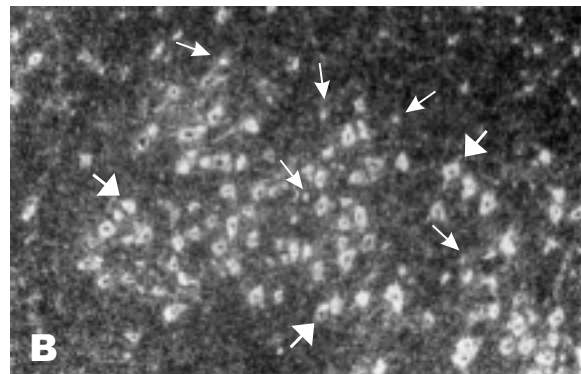
Abb. 3.10

Kontrolle

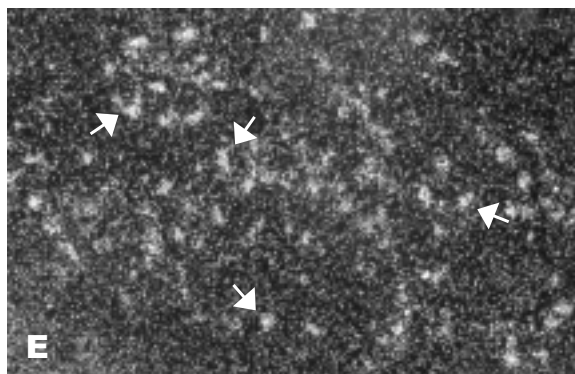
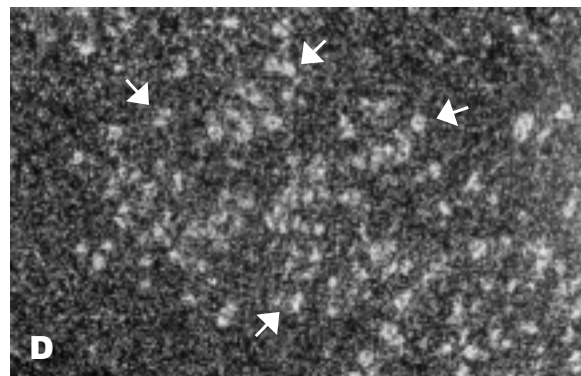


Typ-I

Axotomie



Typ-II



Typ-III

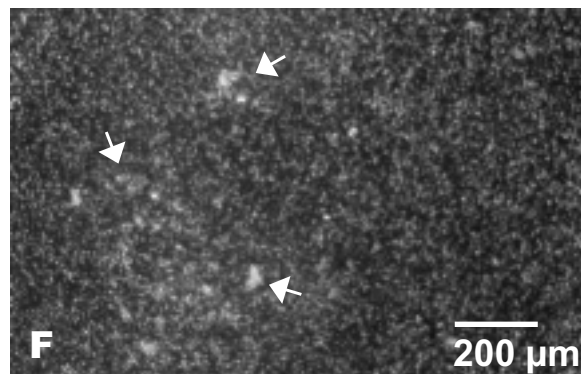


Abb. 3.13